

Academiejaar 2012 - 2013

Osteogenesis Imperfecta: meer dan alleen collageen?

Michaël VANDEN BULCKE

Promotor: Prof. Dr. Anne De Paepe
Co-promotor: Dr. Sofie Symoens

Scriptie voorgedragen in de 2^{de} Master in het kader van de opleiding

MASTER OF MEDICINE IN DE GENEESKUNDE

Voorwoord

In het derde jaar geneeskunde kregen we een lijst met verschillende masterproefonderwerpen voorgeschoteld. Na een lang proces van wikken en wegen werd een selectie gemaakt van de, naar mijn mening, tien meest interessante topics. Helemaal bovenaan prijkte het onderwerp van deze thesis: “Osteogenesis imperfecta: meer dan alleen collageen?”. De twee delen van deze titel intrigeerden mij. Zowel de ziekte als de geheimen van haar oorsprong wekten mijn belangstelling. Groot was dan ook mijn vreugde toen ik dit onderwerp toebedeeld kreeg. Nu, na twee jaar intensief werken, acht ik mij nog steeds gelukkig dat ik de kans gekregen heb om mij verder te kunnen verdiepen in deze materie. In de voorbije maanden heb ik veel kennis opgedaan omtrent de broze bottenziekte zelf alsook omtrent de verschillende processen die komen kijken bij het schrijven van een wetenschappelijk werk.

Hoewel het opstellen van deze masterproef een individuele opdracht was, kon deze niet tot stand komen zonder de hulp van een aantal personen. Vooreerst zou ik mijn promotor prof. dr. De Paepe willen bedanken. Zonder haar had ik nooit de opportuniteit gekregen om aan dit onderwerp te mogen werken. Verder zou ik graag mijn dank willen betuigen aan mijn co-promotor dr. Symoens. Door mij bij te staan met raad en daad heeft ze mij, op momenten dat ik door de bomen het bos niet meer kon zien, steeds opnieuw op het juiste pad gezet. De vele mails, contactmomenten, verbeteringen en het bezoek aan het MRB-labo waren van onschatbare waarde bij het schrijven van dit werk. Als laatste zou ik mijn partner en familie willen bedanken. Bij hen kon ik mijn gedachten ter tijd en stond ventileren. Door steeds een luisterend oor en advies te bieden, hebben ze een niet te onderschatten bijdrage geleverd aan deze masterproef.

Er rest mij enkel de toekomstige lezer van dit werk een aangename lees- en leerervaring toe te wensen. Indien de betekenis van bepaalde afkortingen niet gekend is, kan steeds de afkortingenlijst achteraan (bijlage 4) geraadpleegd worden. Moge de talrijke aspecten van osteogenesis imperfecta, de geheimen die ze reeds heeft prijsgegeven en de raadsels die ze nog voor zich houdt, u evenveel fascineren als ze mij gefascineerd hebben.

Inhoudstafel

Abstract.....	1
Inleiding.....	3
1 Collageen.....	3
1.1 De collageenfamilie.....	3
1.2 Biosynthese type I collageen.....	6
2 Osteogenesis Imperfecta.....	14
2.1 Algemeen.....	14
2.2 Epidemiologie.....	14
2.3 Classificatie.....	14
2.4 Klinisch beeld.....	19
2.5 Diagnose.....	20
2.6 Etiologie.....	23
2.7 Behandeling.....	27
2.8 Onderzoeksvraag.....	28
Methodologie.....	29
Resultaten.....	30
1 Gekende genen waarbij een mutatie kan leiden tot AR OI.....	30
1.1 Genen die coderen voor eiwitten die post-translationele modificaties uitvoeren bij de biosynthese van type I collageen (<i>CRTAP, LEPRE1, PPIB</i>).....	30
1.2 Genen die coderen voor chaperone-eiwitten (<i>SERPINH1, FKBP10</i>).....	32
1.3 Genen die coderen voor proteïnen die instaan voor de maturatie van type I collageen en voor de vorming van de cross-links (<i>BMPI, PLOD2</i>).....	33
1.4 Genen die coderen voor eiwitten die een functie hebben bij het reguleren van de bothomeostase (<i>SERPINF1, SP7, TMEM38</i>).....	35
2 Pathofysiologie.....	37
2.1 ER-stress.....	37
2.2 Dysfunctionele ECM en mineralisatie.....	40
2.3 Verstoorde cel-matrix en cel-cel interacties.....	40
3 Kandidaatgenen waarbij mutaties mogelijk OI zouden kunnen veroorzaken.....	41
3.1 P4H.....	41
3.2 PDI.....	41
3.3 Protein-lysine 6-oxidase.....	41
3.4 Bip, Calnexine, GRP94 en andere aspecifieke chaperone-eiwitten.....	42

4	Kandidaatgenen waarbij mutaties leiden tot andere bindweefselaandoeningen	43
4.1	<i>PLOD1</i>	43
4.2	<i>PLD3</i>	43
4.3	<i>ADAMTS2</i>	44
	Discussie en conclusie	45
	Referentielijst.....	49
	Bijlagen.....	I

Abstract

Osteogenesis Imperfecta (OI), ook wel de broze bottenziekte genoemd, is een erfelijke bindweefselaandoening die gekenmerkt wordt door een lage botmassa, een hoge botfragiliteit en het frequent optreden van botbreuken. Andere vaak voorkomende manifestaties van de ziekte zijn: gehoorverlies, afwijkende tandvorming, blauwe sclerae en een abnormaal kleine gestalte. Het klinisch spectrum van de ziekte is zeer uitgebreid en varieert van mild tot letaal.

Type I collageen is het dominante eiwit in de extracellulaire matrix (ECM) van weefsels zoals bot en huid en is bovendien essentieel voor een correcte botvorming. Dit proteïne is een heterotrimere molecule, die opgebouwd is uit drie verschillende polypeptide ketens, α -ketens genaamd (twee $\alpha 1$ -ketens en één $\alpha 2$ -keten). Defecten in de biosynthese van type I collageen liggen aan de basis van OI. OI kan zowel autosomaal dominant als autosomaal recessief overgeërfd worden. De autosomaal dominante vorm van OI (AD OI) is de meest voorkomende vorm ($\geq 90\%$) en wordt veroorzaakt door heterozygote gendefecten in de genen die coderen voor type I collageen, namelijk *COL1A1* en *COL1A2* of, in zeer zeldzame gevallen, in het *IFITM5*-gen. De autosomaal recessieve vorm (AR OI) wordt veroorzaakt door homozygote of compound heterozygote mutaties in genen die coderen voor; eiwitten die betrokken zijn in post-translationele modificaties (*CRTAP*, *LEPRE1*, *PPIB*, *BMP1* en *PLOD2*), eiwitten die type I procollageen chaperoneren tijdens de biosynthese (*FKBP10* en *SERPINH1*) alsook eiwitten waarvan de link met type I collageen tot op heden onduidelijk is (*SP7*, *SERPINF1* en *TMEM38B*).

In deze masterproef werd een uitgebreid literatuuronderzoek gedaan naar de reeds gekende oorzaken van AR OI. In totaal werden 10 genen gevonden waarbij aangetoond is dat mutaties aanleiding kunnen geven tot AR OI. Deze zijn *CRTAP*, *LEPRE1*, *PPIB*, *FKBP10*, *SERPINH1*, *BMP1*, *PLOD2*, *SERPINF1*, *SP7* en *TMEM38B*. Hiernaast werden de reeds gekende, gemeenschappelijke pathofysiologische mechanismen via dewelke mutaties leiden tot het klinische beeld van OI neergeschreven. De nonsense-mediated mRNA decay (NMD) van mutante transcripten, ophoping van slecht of niet opgevouwen eiwitten in het endoplasmatisch reticulum (ER), ook wel ER-stress genoemd, een dysfunctionele ECM en verstoorde cel-matrix en cel-cel interacties blijken een cruciale rol te spelen in deze mechanismen.

Ten slotte werden andere genen die mogelijks AR OI zouden kunnen veroorzaken, naar voren geschoven. Er werd hierbij gefocust op genen waarvan de proteïnen een rol spelen in de biosynthese van type I collageen (P4H, PDI en proteïn-lysine 6-oxidase) of in de ER-stress cascade (BIP, Calnexine en GRP94). Bij het onderzoek hiernaar bleken sommige kandidaatgenen (*PLOD1*, *PLOD3* en *ADAMTS2*) reeds betrokken bij andere ziekten. Of mutaties in de andere voorgestelde genen daadwerkelijk kunnen leiden tot AR OI, zal door verder onderzoek uitgewezen moeten worden.

Inleiding

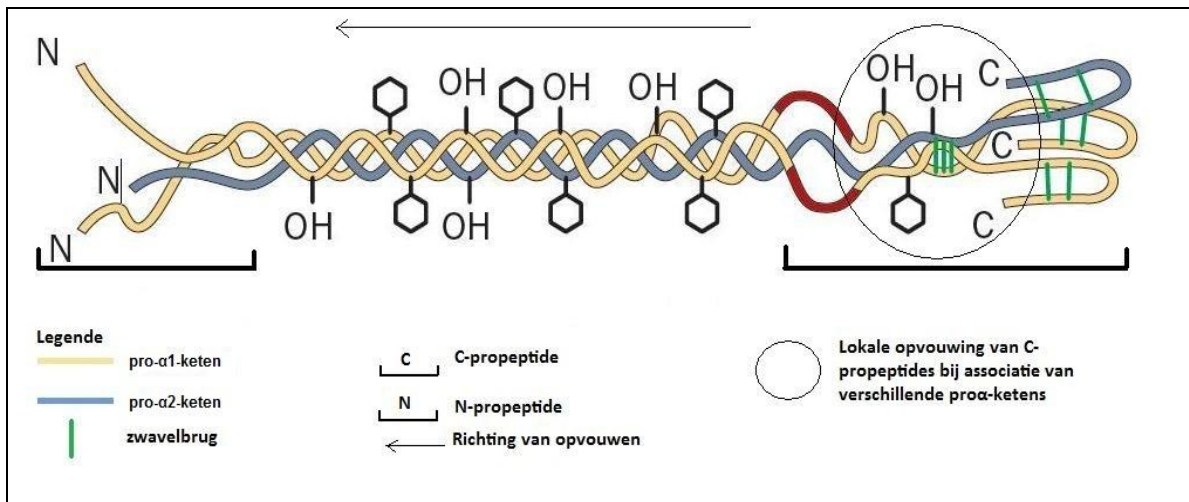
1 Collageen

1.1 De collageenfamilie

Aan de basis van de pathofysiologie van de broze bottenziekte, Osteogenesis Imperfecta (OI) ligt het type I collageen proteïne. Om OI te kunnen begrijpen, is het nodig de eigenschappen en biosynthese van dit proteïne te kennen. Hierna volgt dan ook een beschrijving van de belangrijkste karakteristieken van de collageen eiwitten, een korte bespreking van de verschillende stappen in de biosynthese van type I collageen en wordt de benaming en indeling van deze proteïnen uiteengezet.

Belangrijkste karakteristieken

Collageen wordt gebruikt als groepsnaam voor een familie van eiwitten die voorkomt in de extracellulaire matrix (ECM). De ECM bestaat uit verschillende componenten die onder andere stevigheid en structuur bieden aan alle weefsels waarin deze matrix voorkomt. De matrix heeft echter ook weefsel-specifieke functies zoals intercellulaire communicatie. De ECM zelf vormt een onderdeel van het bindweefsel. Bindweefsel vormt één van de 4 grote klassen weefsels die klassiek worden onderscheiden. De andere klassen zijn spier-, epitheel- en zenuwweefsel. Voorbeelden van bindweefsels zijn kraakbeen en bot. De collagenen vormen de meest abundante proteïnen van de bindweefsels en zelfs van het hele menselijk lichaam. Ze maken immers meer dan 30% van de totale proteïnemassa uit. Ze komen voor in bijna alle organen en zijn onmisbaar bij het behoud van de structuur ervan. Ze vervullen ook een functie in een waaier aan andere processen zoals celadhesie, wondheling, remodelering van weefsel,... Er zijn reeds 28 verschillende collageentypes gedefinieerd die allen bestaan uit 3 alfa-ketens (α -ketens) die onderling opvouwen tot een triple helix (zie figuur 1). Deze triple helixstructuur is het belangrijkste kenmerk van de collagenen. (1, 2)



Figuur 1: Structuur van het type I procollageen heterotrimeer. Twee α 1(I)-ketens en één α 2(I)-keten associëren ter hoogte van hun C-propeptide domein (omcirkeld in de figuur). Er worden zwavelbruggen gevormd zowel in het C-propeptide domein van één keten (intrachain) als tussen de verschillende C-propeptide domeinen van de verschillende α -ketens (interchain). Na de voltooiing van de associatie vangt de triple helixvorming aan. Deze start aan de zijde van het C-propeptide en schrijdt voort naar de N-terminus.(3)

Korte bespreking biosynthese type I collageen

De genen die coderen voor de collageentypes bevinden zich op verschillende chromosomen. Nadat transcriptie en translatie (zie 1.2.1) hebben plaatsgevonden, wordt een primaire aminozuurstreng gevormd.

Deze streng wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van een domein met een specifieke aminozuursequentie die in de uiteindelijke proteïnemolecule, vervat zal zitten in het triple helixgedeelte. Deze sequentie bestaat uit een lange aaneensluiting van tripletten¹ waarbij op elke eerste plaats een glycine (Gly) residu aanwezig is. Zo een triplet kan symbolisch voorgesteld worden door 'Gly-X-Y'. De aanwezigheid van het glycine aminozuur op elke eerste plaats is nodig om de sterische hinder aan de binnenzijde van de triple helix te minimaliseren. Aangezien glycine als zijgroep één waterstofmolecule bevat, is dit aminozuur uitermate geschikt voor deze functie. De twee andere plaatsen van het triplet, voorgesteld door 'X' en 'Y', kunnen in theorie door verschillende aminozuren worden ingenomen. *In vivo* zien we echter dat voornamelijk proline en hydroxyproline deze plaatsen invullen. Hun zijketens zijn gericht naar de buitenzijde van de triple helix zodat ze de opvouwing niet hinderen. Daarenboven vormen hun zijketens ideale bindingssites voor vele moleculen en kunnen ze gebruikt worden om waterstofbruggen te vormen. Deze waterstofbruggen zijn nodig om de stabiliteit van de collageen proteïnen te verzekeren.

¹ opeenvolging van drie aminozuren

De specifieke 'Gly-X-Y' sequentie komt niet voor over de ganse aminozuurstreng. Zo bevindt zich aan weerszijden van de triple helix een sequentie van 8 aminozuren die de telopeptiden worden genoemd. Zij worden niet mee afgeknipt bij de klieving van de propeptides² en blijven bijgevolg vastgehecht aan de mature triple helix. Ook de globulaire domeinen van zowel het N- als het C-propeptide zullen deze strikte tripletrangorde niet volgen. Toch zijn deze essentieel bij de vorming van de triple helix (zie 1.2.3).

De primaire aminozuurketen ondergaat vervolgens een lokale opvouwing waarbij waterstofbruggen gevormd worden. Op deze manier ontstaat de secundaire eiwitstructuur, de pro- α -keten. De pro- α -ketens worden ook wel monomeren genoemd. Drie monomeren zullen samen de trimere collageen molecule opbouwen. De monomeren kunnen identiek zijn en zo een homotrimeer vormen of ze kunnen verschillen van elkaar en bijgevolg een heterotrimere collageen molecule vormen.

De selectie van de pro- α -ketens, met andere woorden welke pro- α -ketens er gebruikt zullen worden om het collageen eiwit te vormen, wordt bepaald door het C-propeptide. De associatie van de 3 pro- α -ketens begint ter hoogte van de C-terminus. Bij de associatie treedt er een lokale opvouwing op en worden er zwavelbruggen gevormd zowel in de C-propeptides zelf als tussen de verschillende C-propeptides onderling. Deze zwavelbruggen ontstaan tussen twee cysteine residuen waarbij het proteïne disulfide isomerase (PDI) als katalysator optreedt. Na de voltooiing van de associatie kan de triple helixvorming aanvatten. Deze begint ter hoogte van de C-terminus en schrijdt voort naar de N-terminus.

In een laatste stap worden de propeptides van de pro- α -ketens afgeknipt en ontstaat de mature collageen molecule. Deze kan, naargelang het type collageen, supramoleculaire aggregaten vormen zoals een fibril. (1, 2, 4, 5)

Benaming en indeling

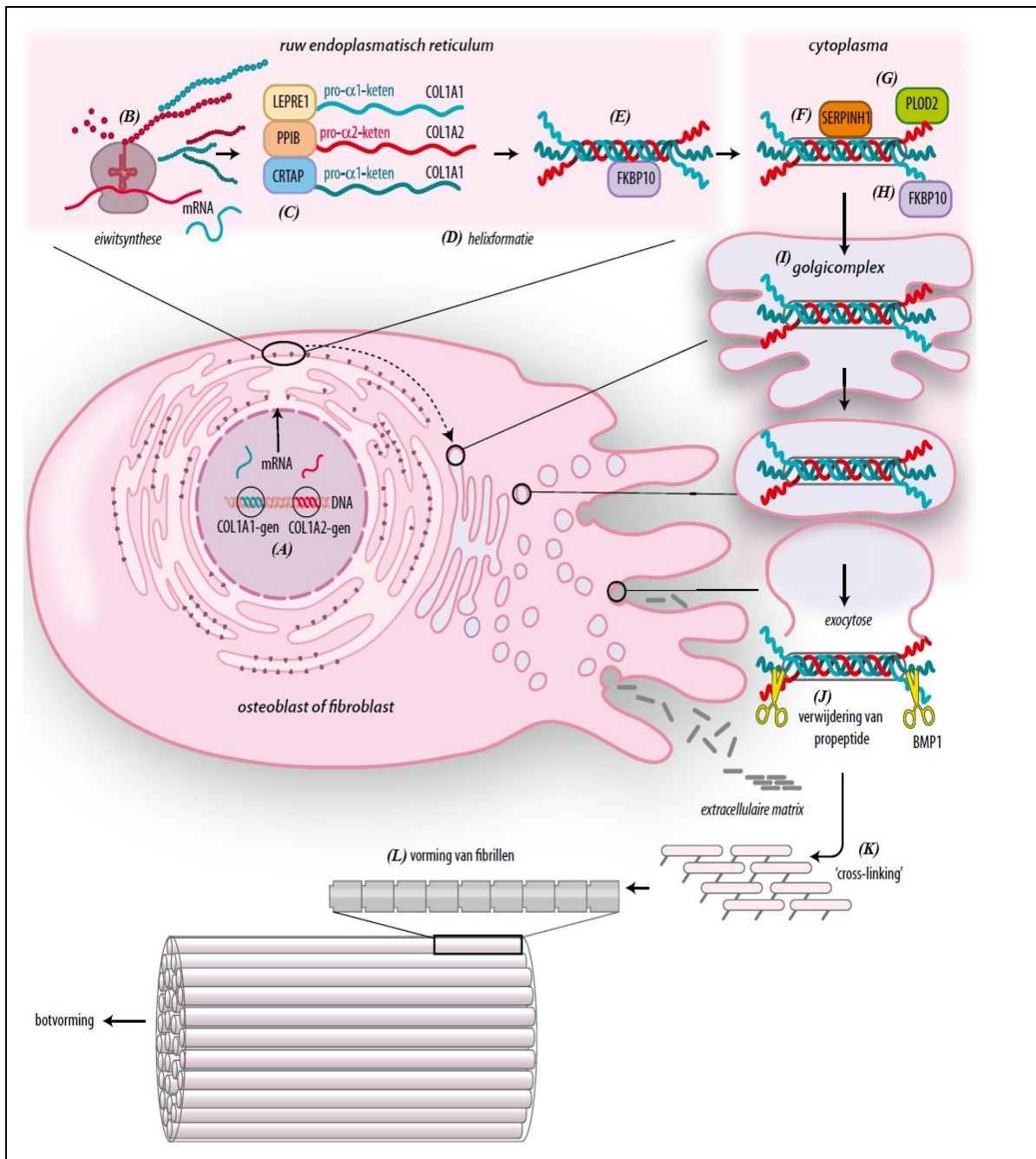
De benaming van de collagenen gebeurt aan de hand van het soort α -ketens waaruit ze bestaan. Via Romeinse cijfers en de opsomming van de soorten monomeren die de collageen trimeer bevat, ontstaat er een unieke identificatie. Zo zal bijvoorbeeld het type I collageen, waarvan de trimeer bestaat uit twee $\alpha 1$ ketens ($\alpha 1(I)$) en één $\alpha 2$ keten ($\alpha 2(I)$), neergeschreven worden als $[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I).(1)$

² aminozuursequenties aan het uiteinde van de streng die in een later stadium worden afgeknipt van het proteïne dat op deze manier geactiveerd wordt. Er wordt een carboxyl-terminaal (C) en een amino-terminaal (N) propeptide onderscheiden

De indeling van de collageenfamilie wordt dan weer voornamelijk gedaan op basis van hun structuur en supramoleculaire organisatie. Ze verschillen echter ook van elkaar op andere vlakken zoals functie, distributie, aanwezigheid van non-helix domeinen en assemblage. Zo worden verschillende subgroepen onderscheiden waarvan de belangrijkste de fibrilvormende of fibrillaire collagenen zijn. Type I collageen behoort tot deze groep. De fibrillaire collagenen vormen grote supramoleculaire aggregaten bestaande uit vele triple helices die onderling met elkaar geassocieerd zijn. Ze hebben een specifieke oriëntatie die kan verschillen van weefsel tot weefsel maar zeer herkenbaar is onder de elektronenmicroscopie als een typisch zwart-wit alternerend bandenpatroon.(1)

1.2 Biosynthese type I collageen

In het vorige hoofdstuk werd een beknopte samenvatting van de biosynthese van collageen gegeven. Om de pathogenese van OI en de resultaten van deze masterproef te kunnen begrijpen, is een grondigere kennis van de vorming van type I collageen eiwitten vereist. Hieronder volgt een uitgebreide beschrijving van de biosynthese van dit type collageen. Deze begint bij de transcriptie en eindigt bij de integratie van collageen fibrillen in de ECM.(2) Als leidraad doorheen dit geheel kan volgende figuur gebruikt worden. (Figuur 2)



Figuur 2: Biosynthese van type I collageen en vorming van fibrillen. Het *COL1A1* gen en *COL1A2* gen worden getranscribeerd in de kern van de osteoblast of fibroblast (A). Vervolgens vindt de translatie, uitgevoerd door ribosomen, plaats in het rER (B). Hierna wordt de 3-hydroxylatie van proline uitgevoerd door het prolyl 3-hydroxylatiecomplex bestaande uit P3H1, gecodeerd door *LEPRE1*, *CRTAP* en *PPIB* (C). Ondertussen start de helixformatie aan de zijde van het C-propeptide (D). Vervolgens voert *FKBP65*, gecodeerd door het *FKBP10*, de peptidyl-prolyl cis-transisomerisatie van de peptidebindingen van proline- en hydroxyprolinerisiduen uit. Terwijl LH, gecodeerd door *PLD2*, bepaalde lysine residuen zal hydroxyleren (G), voeren *HSP47*, gecodeerd door *SERPINH1* en *FKBP65* hun chaperonetaak uit (F en H). De type I procollageen moleculen worden getransporteerd doorheen het Golgi-apparaat alvorens ze via exocytose in de ECM vrijkomen (I). Eenmaal in de ECM worden het N- en C-propeptide van het proteïne geknipt door respectievelijk een N- en C-propeptidase (J). Deze laatste wordt gecodeerd door het *BMP1* gen. Hierna vindt de cross-linking plaats (K), uitgevoerd door proteïn-lysine 6-oxidase dat wordt gecodeerd door het *LOX* gen. Ten slotte zullen de mature type I collageen moleculen spontaan tot fibrillen aggregeren (L). Volgende stappen worden niet weergegeven in de figuur: de 4-hydroxylatie van proline residuen door L-proline trans-4-hydroxylase, de glycosylatie van gehydroxyleerd lysine en de vorming van zwavelbruggen door *PDI*.(6)

1.2.1 Transcriptie en translatie

De α -ketens van het type I collageen eiwit worden gecodeerd door genen die zich bevinden op chromosoom 17 (*COL1A1* gen) en chromosoom 7 (*COL1A2* gen). De transcriptie³ (figuur 3: A) van deze genen hangt af van het soort cel (fibroblast, osteoblast,...) waarin de collageen productie plaatsvindt. Ook extracellulaire factoren zoals groeifactoren kunnen de transcriptie van deze genen beïnvloeden. Eenmaal overgeschreven moeten de intronen⁴ uit het transcript, ook wel pre-messenger ribonucleïnezuur (pre-mRNA) genoemd, geknipt worden (splicing). Op deze manier kunnen de exonen⁵ aan elkaar geplakt worden. Het bekomen, verknipte pre-mRNA vormt uiteindelijk het messenger RNA (mRNA). Dit mRNA wordt getransporteerd naar het cytoplasma alwaar het door vrije ribosomen wordt vertaald⁶ (translatie) (figuur 3: B). Als eerste wordt het signaalpeptide vertaald. Dit peptide zorgt ervoor dat het vervolg van de translatie van de mRNA-streng zal plaatsvinden in het ruw endoplasmatisch reticulum (rER). De bekomen eiwitsequentie, de prepro- α -keten, wordt omgezet naar de pro- α -keten door middel van een specifiek signaalpeptidase. Dit enzym zal de signaalpeptidesequentie, dat nog steeds vastgehecht is aan het uiteinde van de aminozuurstreng, eraf knippen. De pro- α -keten ondergaat vervolgens verschillende post-translationele modificaties.(1)

1.2.2 Intracellulaire post-translationele modificaties

Deze modificaties vinden plaats in de cisternen van het rER en het cytoplasma. Ze starten terwijl de translatie bezig is en zetten zich post-translationeel verder totdat de triple helixvorming beëindigd is.(2)

1.2.2.1 4-hydroxylatie van proline

Een belangrijke post-translationele modificatie is de 4-hydroxylatie van proline residuen. Dit wordt gekatalyseerd door het enzym L-proline trans-4-hydroxylase (P4H). Dit eiwit bevindt zich in het rER. Het bestaat uit vier eenheden: twee α - en twee β -eenheden. Deze worden gecodeerd door genen op verschillende chromosomen. De β -subunit is eigenlijk een proteïne disulfide isomerase (PDI). Om zijn hydroxylatiefunctie uit te voeren heeft het P4H cofactoren⁷ nodig. Deze zijn ijzer, 2-oxoglutaraat, zuurstof en ascorbinezuur.

³ overschrijven van de gensequentie

⁴ niet coderende sequenties in het pre-mRNA

⁵ coderende sequenties in het pre-mRNA

⁶ omzetten van het genetisch transcript (mRNA) in de overeenkomstige eiwitstructuur

⁷ stof die, samen met het enzym, noodzakelijk is voor het plaatsvinden van bepaalde enzymatische reacties

De gevormde 4-hydroxyproliner residuen zorgen voor intramoleculaire waterstofbruggen en dragen op deze manier bij aan de stabiliteit van de collageen molecule. Indien de hydroxylatie niet gebeurt, kunnen de collageen moleculen denatureren bij temperaturen lager dan de normale menselijke lichaamstemperatuur. (1, 2, 4)

1.2.2.2 3-hydroxylatie van proline

Deze modificatie wordt uitgevoerd door het prolyl 3-hydroxylatiecomplex (figuur 3: C). Dit complex bestaat uit drie componenten namelijk prolyl 3-hydroxylase 1 (P3H1), cartilage associated protein (CRTAP) en cyclophiline B (CyPB). Zij zullen specifieke proline residuen 3-hydroxyleren. Zo zal het proline residu op positie 986 (Pro986) van de $\alpha(1)$ -ketens bij type I collageen deze modificatie ondergaan. In het merendeel van de gevallen zal ook het Pro707-aminozuur van de $\alpha(2)$ -ketens gehydroxyleerd worden. Wat de exacte rol van deze hydroxylatie is, is niet volledig geweten. Indien ze echter niet uitgevoerd wordt, blijft de opvouwing tot een triple helix haperen wat tot overmodificatie leidt van de gehele type I procollageen molecule. Bovendien zou de hydroxylatie een functie vervullen in de interacties tussen het collageen en eiwitten die belangrijk zijn in de botvorming. Naast deze hydroxylase activiteit voert het complex ook een chaperonetaak uit. Het zorgt er namelijk voor dat premature aggregatie van procollageen moleculen tot fibrillen niet plaatsvindt.(3, 7)

Prolyl 3-hydroxylase 1 (P3H1)

Dit enzym wordt gecodeerd door het *LEPRE1* gen dat zich op chromosoom 1 bevindt. Het neemt de enzymactiviteit van het prolyl 3-hydroxylatiecomplex voor zijn rekening. Het behoort tot de familie van de 2-oxoglutaraat dioxygenases en heeft ijzer, 2-oxoglutaraat, zuurstof en ascorbinezuur als cofactoren nodig (zie 1.2.2.1). Het bevat bovendien een KDEL-aminozuursequentie⁸ die ervoor zorgt dat het enzym het rER niet verlaat.(3, 8)

Cartilage Associated protein (CRTAP)

Het CRTAP-proteïne wordt gecodeerd door het *CRTAP* gen dat zich op chromosoom 3 bevindt. Het fungeert als een helpereiwit in het complex. Zijn exacte functie is nog niet volledig opgehelderd. Opmerkelijk is dat dit eiwit grote gelijkennis vertoont met het P3H1-enzym. Het mist echter de katalyseactiviteit.(3, 8)

⁸ sequentie van aminozuren die ervoor zorgt dat eiwitten naar het endoplasmatisch reticulum worden gebracht vanuit het Golgi-apparaat. De letters van KDEL staan voor de aminozuren die zich in de sequentie bevinden, namelijk: lysine (K), asparaginezuur (D), glutaminezuur (E) en leucine (L)

Cyclophiline B (CyPB)

Cyclophiline B, ook wel peptidyl-prolyl isomerase B (PPIB) genoemd, vormt de derde component van het prolyl 3-hydroxylatiecomplex. Het wordt gecodeerd door het *peptidyl-prolyl isomerase B* gen dat zich op chromosoom 15 bevindt. Zoals de naam van het coderende gen reeds doet vermoeden, behoort CyPB tot de familie van de peptidyl-prolyl isomerasen. Deze kunnen de *cis*-conformatie van aminozuren modificeren tot een *trans*-conformatie⁹. CyPB doet dit bij bepaalde proline residuen. Het isomerisatieproces vormt een snelheidsbepalende stap in de collageen synthese. Aminozuren met een *trans*-conformatie zijn immers stabiel en dit bevordert de snelheid waarmee de triple helix gevormd wordt. Het isomerisatieproces kan ook uitgevoerd worden door het FKBP65 eiwit (zie 1.2.2.5).(3, 9)

1.2.2.3 Hydroxylatie van lysine

Deze post-translationele modificatie houdt de hydroxylatie van bepaalde lysine residuen in (figuur 3: G). Hier speelt lysyl hydroxylase (LH), dat onder andere gecodeerd wordt door het *PLOD1*- en *PLOD2* gen, een belangrijke rol. *PLOD1* codeert voor LH1 dat specifieke lysine residuen in het triple helixdomein van type I procollageen zal hydroxyleren. *PLOD2* codeert voor LH2 dat lysine residuen in de telopeptideregio voor zijn rekening neemt.(10) Gehydroxyleerd lysine heeft twee belangrijke functies. Vooreerst vormt het een aanhechtingsplaats voor suikergroepen zoals galactosyl en glucosylgalactose. Als tweede functie zorgen de hydroxylysine residuen ervoor dat cross-linking tussen de verschillende collageen moleculen mogelijk wordt. Dit is nodig voor de vorming van collageen fibrillen in de ECM.(1, 2)

1.2.2.4 Glycosylatie

Gehydroxyleerd lysine kan geglycosyleerd worden. Suikergroepen zoals galactosyl en glucosylgalactose kunnen via een covalente binding aan de pro- α -keten gehecht worden. Dit wordt gekatalyseerd door respectievelijk hydroxylysyl-galactosyltransferase en galactosylhydroxylysyl-glucosyltransferase. Het aantal hydroxylysineresiduen dat wordt geglycosyleerd is zeer variabel en hangt af van het type collageen, het soort weefsel en de leeftijd van het individu. Ook op bepaalde arginine residuen in de telopeptidesequenties worden suikergroepen geplaatst. De functie hiervan is nog niet bekend.(1, 2)

⁹ 'cis-' en 'trans-conformatie' verwijst naar de plaats van de zijgroepen. Bij een *cis*-conformatie bevinden de zijgroepen zich aan dezelfde zijde en bij een *trans*-conformatie bevinden ze zich aan weerszijden.

1.2.2.5 Peptidyl-prolyl *cis-trans*isomerisatie door FKBP65

Het FK506-binding protein FKBP65-eiwit, kortweg FKBP65, wordt gecodeerd door het *FKBP10* gen op chromosoom 17. Het eiwit voert onder andere de peptidyl-prolyl *cis-trans*isomerisatie, van de peptidebindingen van proline- en hydroxyproline residuen in het type I procollageen, uit (figuur 3: E).(2) Deze isomerisatie is, zoals eerder aangehaald, waarschijnlijk de snelheidslimiterende stap in het collageen syntheseproces.(11) Ze kan uitgevoerd worden door zowel de leden van de FKBP-familie als door CyPB. Uit onderzoek blijkt dat voornamelijk CyPB deze taak op zich neemt.(12)

1.2.2.6 Vorming van zwavelbruggen

Het PDI voert deze post-translationele modificatie uit. PDI assisteert bij het opvouwen van verschillende eiwitten. Het bevindt zich in het rER en zorgt bij de synthese van type I collageen voor de vorming van zwavelbruggen. Deze zwavelbruggen worden, onder andere, teruggevonden in en tussen de C-propeptides van de drie pro- α -ketens, waar ze nodig zijn voor stabiliteit en correcte alignatie.(5) Naast de vorming van disulfidebruggen vormt PDI ook een belangrijk onderdeel van het P4H-enzym (zie 1.2.2.1).(4)

1.2.3 Triple helixvorming

Tijdens al deze intracellulaire co- en post-translationele modificaties zullen drie pro- α -ketens, twee $\alpha 1(I)$ en één $\alpha 2(I)$, aligneren om de vorming van de triple helix mogelijk te maken (figuur 3: D). Deze associatie gebeurt eerst op een non-covalente manier maar wordt snel gestabiliseerd door zwavelbruggen in het C-propeptide.(5) Het verweven van de drie pro- α -ketens start aan de C-terminus en schrijdt voort naar de N-terminus. Zolang de helix nog niet volledig gevormd is kunnen er nog post-translationele modificaties plaatsvinden. Eenmaal de helixvorming voltooid is, vormt de procollageen molecule een stabiele structuur die resistent is tegen proteolytische afbraak. Deze moleculen zullen vervolgens door het Golgi-complex passeren alvorens ze de laatste stappen van de secretieroute voor extracellulaire proteïnes ondernemen.(2)

1.2.4 Chaperone-eiwitten

Naast de enzymen die de post-translationele modificaties uitvoeren zijn er ook een aantal andere eiwitten die geen enzymatische functie hebben maar toch een belangrijke rol spelen bij het type I collageen biosyntheseproces. Ze zorgen ervoor dat de pro- α -ketens correct opvouwen tot procollageen en dat er geen premature aggregatie kan plaatsvinden.(11)

1.2.4.1 Heat shock protein 47 (HSP47)

Het Hsp47-eiwit wordt gecodeerd door het *SERPINH1* gen. Het is een hitte shock proteïne dat een KDEL-sequentie bevat waardoor het gerecycleerd kan worden naar het ER. Hsp47 interageert voornamelijk met het triple helix domein van de reeds gevormde procollageen triple helices en begeleidt hen van het rER naar het *cis*-Golgi-netwerk (figuur 3: F). Daar dit eiwit enkel correct opgevouwen type I procollageen triple helices zal escorteren, biedt het een soort kwaliteitsgarantie in het collageen biosyntheseproses. Bovendien kan Hsp47 de premature aggregatie van procollageen tot fibrillen verhinderen.(11)

1.2.4.2 FK506-binding protein FKBP65

Dit eiwit van het rER werd reeds besproken bij de intracellulaire post-translationele modificaties. Naast zijn peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase activiteit oefent dit enzym ook een chaperonefunctie uit. FKBP65 kan zowel met afzonderlijke pro- α -ketens als met triple helices interageren. Bij de pro- α -ketens verhindert het de premature associatie van deze ketens tot triple helices. Bij de triple helices zorgt dit enzym ervoor dat de fibrilvorming of aggregatie wordt uitgesteld (figuur 3: H).(12)

1.2.4.3 PDI

PDI vervult reeds een functie als katalysator bij het vormen van zwavelbruggen en als onderdeel van P4H. Een laatste functie die het op zich neemt is het chaperoneren van pasgevormde procollageen moleculen. Op deze manier wordt hun aggregatie tot fibrillen verhinderd en uitgesteld tot in de ECM.(4)

1.2.5 Extracellulaire post-translationele modificaties

Deze vinden plaats nadat de procollageen moleculen via Golgi-transportvesikels naar de plasmamembraan zijn vervoerd (figuur 3: I). De transportvesikels zullen versmelten met deze membraan en hun inhoud, de procollageen moleculen, vrijstellen in de ECM. Om type I collageen triple helices te bekomen die in staat zijn fibrillen te vormen, moeten deze heterotrimere moleculen nog een paar veranderingen ondergaan.

1.2.5.1 Afsplitsen van de N- en C-propeptides

De propeptiden die zich aan de N- en C-terminus van het procollageen bevinden dienen verwijderd te worden (figuur 3: J). Eén van de primaire functies van de propeptiden is ervoor te zorgen dat de procollageen molecule oplosbaar blijft in het intracellulaire milieu en dat vroegtijdige aggregatie wordt tegengegaan.(2) Na een correcte opvouwing van het procollageen, mogen ze verwijderd worden.

Dit gebeurt respectievelijk door de specifieke, zink afhankelijke, neutrale metalloproteïnasen: procollageen N-proteïnase en procollageen C-proteïnase. Het procollageen N-proteïnase wordt gecodeerd door het *A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 2* gen (*ADAMTS2* gen) dat gelokaliseerd is op chromosoom 5. Het procollageen C-proteïnase wordt gecodeerd door het *Bone Morphogenetic protein 1* gen (*BMP1* gen) op chromosoom 8. Het afknippen van deze prosequence's is een belangrijke stap in het zelfassemblageproces van de collageen fibrillen.⁽⁵⁾ Bovendien zouden de afgeknipte propeptiden een rol spelen in een feedbackmechanisme dat de synthese van collageen regelt.⁽²⁾

1.2.5.2 Cross-linking

Dit wordt uitgevoerd door proteïn-lysine 6-oxidase dat wordt gecodeerd door het *LOX* gen op chromosoom 5. Het enzym katalyseert de deaminatie van specifieke lysine en hydroxylysine residuen in de procollageen moleculen (figuur 3: K). Deze residuen zullen bij de fibrilvorming in staat zijn om cross-links te vormen die op hun beurt nodig zijn om de kenmerkende trekvastheid van het collageen te garanderen.⁽²⁾

1.2.6 Fibrillogenese

Het uiteindelijke product van deze synthese zijn collageen moleculen met een lengte van ongeveer 300 nanometer en een diameter van ongeveer 1,5 nanometer. Dit komt overeen met een duizendtal aminozuren. Deze zullen spontaan tot fibrillen en vezels aggregeren (figuur 3: L). De aggregatie gebeurt zowel in de lengte als de breedte. Hoe dit proces precies tot stand komt, is nog niet volledig geweten. Wat wel bekend is, is dat de entropie¹⁰ een drijvende kracht vormt.^(1, 2)

¹⁰ maat van wanorde of de afname van bruikbare energie

2 Osteogenesis Imperfecta

2.1 Algemeen

OI is een erfelijke bindweefselaandoening. De ziekte heeft een breed klinisch spectrum en kan variëren van mild tot letaal. Karakteristieke afwijkingen van de broze bottenziekte zijn een lage botmassa en een hoge botfragiliteit. Dit zorgt ervoor dat OI-patiënten vaak breuken vertonen na een gering trauma of zelfs spontaan. De oorzaak is bijna altijd een mutatie in de genen die een rol spelen in de biosynthese van type I procollageen.(3) Hierna volgt een bespreking van de epidemiologie, de classificatie, de kliniek, de diagnose, de etiologie en ten slotte de behandeling van deze congenitale aandoening.

2.2 Epidemiologie

Exacte gegevens over de prevalentie en incidentie van OI zijn moeilijk te verzamelen. Dit heeft verschillende redenen. Ten eerste worden er verschillende criteria gehanteerd om OI te diagnosticeren. Ook de gebrekkige kennis over de ziekte bij gezondheidsmedewerkers speelt een rol. Ten slotte loopt de registratie van de verschillende types van OI niet steeds zonder problemen. Door al deze factoren variëren de incidentiecijfers, die worden teruggevonden in de wetenschappelijke literatuur over OI, van 1 tot 10 op 100.000. De aandoening komt voor bij alle menselijke rassen en etnische groepen.(13, 14)

2.3 Classificatie

Reeds in 1978 stelde de Australische wetenschapper David Sillence voor om verschillende types in het ziektebeeld van OI te onderscheiden.(15) Zijn onderverdeling in vier subtypes, OI I-IV, was gebaseerd op klinische, radiografische en genetische criteria. In 1984 werd type II nog verder onderverdeeld in subtype A, B en C op basis van radiologische verschillen. Meer dan 30 jaar later wordt de Sillence classificatie, zij het in een aangepaste vorm, nog steeds gebruikt in de klinische praktijk. Het grootste probleem waarmee de oorspronkelijke verdeling te kampen heeft, is dat ze onderverdeelt op basis van klinische parameters die in werkelijkheid een continuüm vormen en geen uitgesproken afzonderlijke eenheden vormen.(3, 13, 15)

Heden ten dage worden twee verschillende classificaties gebruikt. De eerste concentreert zich op de genetische defecten. Voor elk gen waarvan ontdekt wordt dat mutaties aanleiding kunnen geven tot OI, wordt een nieuw OI-type gedefinieerd. Deze types komen als aanvulling op de reeds bestaande Sillence indeling, waarbij de gendefecten ondertussen ook gekend zijn.(Bijlage 1: TABEL1)

De tweede classificatie baseert zich op het fenotype¹¹ van OI. Enkel OI types die duidelijk van elkaar verschillen op klinisch, radiologisch en histologisch vlak, worden hierbij als apart type erkend. **(Bijlage 2: TABEL2)**

Welke onderverdeling de voorkeur verdient, valt te bediscussiëren. De eerste classificatie is, in het opzicht van deze masterproef, geschikter en zal bijgevolg gebruikt worden. In deze indeling worden voorlopig 14 types erkend, respectievelijk benoemd met Romeinse cijfers I tot en met XIV. Daar de toekenning van de types aan de verschillende gendefecten internationaal nog niet is vastgelegd, werd er voor deze masterproef een eigen toekenning opgesteld. **(Bijlage 3: TABEL3)**

Bij OI type I tot en met IV wordt de oorzaak gevonden in de genen die coderen voor type I procollageen, namelijk *COL1A1* en *COL1A2*. Deze types vertonen een autosomaal dominant (AD) overervingspatroon. Belangrijke opmerking hierbij is dat de relatie tussen het geno- en fenotype van AD OI zeer variabel is. Het is vaak onmogelijk om de specifieke klinische manifestaties van een mutatie te voorspellen. In sommige gevallen kan wel de ernst van de ziekte aan de hand van de mutatie worden ingeschat. De oorzaak van type V tot en met XIV zijn defecten in de genen waarvan de producten een rol spelen in de biosynthese van type I collageen of in de bothomeostase. Deze vormen van OI worden autosomaal recessief (AR) overgeërfd met uitzondering van type V dat een autosomaal dominant patroon volgt. Een AR overerving impliceert dat ze te wijten zijn aan homozygote¹² of compound heterozygote¹³ mutaties. De relatie tussen het geno- en fenotype bij AR OI is meer voorspelbaar dan bij AD OI. (14, 16)

2.3.1 Overzicht types OI

De verschillende types zullen hierna kort besproken worden. Deze vertonen allen het hoofdkenmerk van OI, namelijk botfragiliteit. Verdere informatie omtrent etiologie en pathofysiologie kan gevonden worden in de respectievelijke hoofdstukken.

¹¹ waarneembare kenmerken van een individu, ontstaat door combinatie van genetische aanleg en omgevingsfactoren

¹² twee identieke kopieën van een gen in een chromosomenpaar

¹³ aanwezigheid van twee recessieve allelen voor hetzelfde gen die verschillend zijn van elkaar

Type I

Dit is de mildste vorm van OI. Het type wordt gekenmerkt door een triade van kenmerken. Deze zijn fractures, blauwe sclerae en gehoorverlies. Hyperlaxiteit van de gewrichten kan aanwezig zijn. Patiënten hebben min of meer een normale gestalte en vertonen zelden dentinogenesis imperfecta¹⁴. De verantwoordelijke mutatie wordt gevonden in het *COL1A1* gen.(3, 17)

Type II

Deze vorm is letaal in de perinatale periode¹⁵. De baby's sterven meestal ten gevolge van respiratoir falen. Kenmerken van dit type zijn multipale, vaak reeds intra-uteriene fractures en ernstige botmisvormingen, extreem korte gestalte, smalle thorax met korte ribben die ook multipale fractures kunnen vertonen, blauwgrijze sclerae en een grote, weke schedel die onvolledig of niet verbeend is. De oorzaak zijn mutaties in het *COL1A1* of *COL1A2* gen.(14)

Type III

OI type III is de meest ernstige vorm van de ziekte die nog verenigbaar is met leven. Deze patiënten lopen zeer gemakkelijk enkele tientallen tot honderden breuken op in hun kindertijd. Velen kunnen niet wandelen zonder externe hulp en zijn dus rolstoel gebonden. Ook hun groei is zwaar verstoord; een volwassen lengte van amper één meter wordt vaak gezien. Dentinogenesis imperfecta, een triangulair facies, kyphoscoliose¹⁶, grijze sclerae en gehoorverlies zijn andere klinische manifestaties die aanwezig kunnen zijn. De verantwoordelijke genetische defecten worden teruggevonden in het *COL1A1* of *COL1A2* gen.(14)

Type IV

Dit type vertoont een matig tot ernstig klinisch beeld met als hoofdkenmerken een kleine gestalte, multipale botfracturen en beendermisvormingen. De levensverwachting is beter dan deze bij OI type III. Andere kenmerken zijn dentinogenesis imperfecta, gehoorverlies op volwassen leeftijd en het voorkomen van grijswitte sclerae. De oorzaak is opnieuw mutaties die plaatsvinden in het *COL1A1* of *COL1A2* gen.(14)

¹⁴ aandoening waarbij de tandontwikkeling gestoord is. De tanden zijn verkleurd en breken gemakkelijk.

¹⁵ vanaf de 28ste week van de zwangerschap tot en met de 8ste dag na de geboorte

¹⁶ abnormale kromming van de wervelkolom in het frontale vlak

Type V

Over deze vorm van OI is nog maar weinig gekend. Het fenotype is meestal matig maar kan ook ernstig zijn. Karakteristiek voor dit type is de calcificatie van het interosseus membraan tussen de ulna en de radius. Hierdoor zullen de patiënten een gelimiteerde pro- en supinatie vertonen. Ook een luxatie van de kop van de radius en hyperplastische callusformatie worden frequent gezien. Al deze kenmerken zijn echter niet aanwezig bij de geboorte maar manifesteren zich na verloop van tijd. De sclera zijn wit en er wordt geen dentinogenesis imperfecta gezien. De oorzakelijke mutaties bevinden zich in het *IFITM5* gen.(14, 18)

Type VI

Het klinische beeld van deze vorm verschilt niet zoveel van dat van type V. De morfologie van de botten van deze patiënten is echter wel kenmerkend. De normale oriëntatie van de lamellen is verloren. In plaats daarvan wordt een patroon gezien dat gelijkenissen vertoont met het schubpatroon van een vis. Dit wijst waarschijnlijk op een mineralisatiedefect van het bot. De verantwoordelijke mutaties bevinden zich in het *SERPINF1* gen.(3, 19)

Type VII

Deze vorm van OI vertoont een ernstig tot letaal fenotype. Eén van de karakteristieken van dit type is rhizomelie waarbij de proximale segmenten van de ledematen, met andere woorden de bovenarm en bovenbenen, een abnormale lengte vertonen of er een afwijking is van het schouder- en/of heupgewricht. Ook coxa vara¹⁷ wordt vaak gezien. De sclerae zijn wit en er is geen dentinogenesis imperfecta. De oorzaak wordt gevonden in het *CRTAP* gen.(19)

Type VIII

Dit type is ernstig tot letaal. Rhizomelie, ernstige groeistoornissen, scoliose, congenitale fracturen, ‘popcorn epiphysen’, witte sclerae en ondermineralisatie van de botten behoren tot de kenmerken van type VIII. Deze vorm is het resultaat van mutaties in het *LEPRE1* gen.(3, 14)

Type IX

Ook dit type van OI is ernstig tot letaal. De belangrijkste kenmerken zijn een ernstige groeistoornis, grijs-witte sclerae en korte, gebogen ledematen. Mutaties in het *PPIB* gen kunnen aanleiding geven tot deze vorm.(17)

¹⁷ standafwijking van de heup waarbij de hoek tussen de heupkop en de femur kleiner is dan 120°

Type X

Deze vorm is ernstig tot letaal. Korte, gebogen femura, blauwe sclerae, triangulair facies, dentinogenesis imperfecta en nierstenen worden teruggevonden bij dit type. De causale mutaties worden teruggevonden in het *SERPINH1* gen.(17)

Type XI

Dit type heeft een matig tot ernstig fenotype. Karakteristieken zijn korte ledematen, een smalle mond en witte sclerae. Het doorbreken van de tanden kan vertraagd zijn, maar dit is geenszins een uiting van dentinogenesis imperfecta. Gendefecten in het *SP7* gen leiden tot dit type van OI.(17)

Type XII

Type XII kent een matig tot ernstig klinisch beeld, dat typisch gekenmerkt wordt door een combinatie van botfracturen en contracturen van de grote gewrichten. Grijswitte sclerae, matige tot ernstige scoliosis en botlamellen met een visschubpatroon behoren eveneens tot de karakteristieken. Dentinogenesis imperfecta wordt niet gezien. De etiologie wordt teruggevonden in het *FKBP10* gen. Het klinische beeld dat wordt veroorzaakt door mutaties in dit gen, wordt soms bestempeld als Bruck syndroom type 2 (BS2) (zie 212.5.1).(17)

Type XIII

Deze vorm vertoont een ernstig klinisch beeld. Multipelen fracturen, ernstige deformaties, scoliose, triangulair facies, lichtblauwe sclerae, afwezigheid van dentinogenesis imperfecta en gehoorverlies en een abnormaal grote thorax worden teruggevonden. Mutaties in het *BMP1* gen worden verantwoordelijk geacht voor dit type van OI.(20)

Type XIV

Het fenotype van deze vorm is matig. De patiënten vertonen multipelen fracturen en osteopenie¹⁸. Blauwe sclerae, dentinogenesis imperfecta, gehoorverlies of andere orgaanaantastingen worden niet gezien. De verantwoordelijke mutatie voor dit type vindt plaats in het *TMEM38B* gen.(21)

¹⁸ het bot vertoont een lagere dichtheid dan normaal

2.4 Klinisch beeld

Zoals reeds blijkt uit de classificatie, zijn de mogelijke klinische manifestaties van OI zeer variabel. De mogelijke uitingen van de ziekte in de verschillende orgaanstelsels wordt hieronder weergegeven. De oorzaak van deze afwijkingen moet voornamelijk gezocht worden in het slecht functioneren van het abnormale bindweefsel.(3)

2.4.1 Botafwijkingen

Osteogenesis imperfecta betekent letterlijk imperfecte botvorming. Dit verwijst naar het hoofdkenmerk van de ziekte, namelijk de aanwezigheid van broze beenderen. De oorzaak van deze fragiliteit wordt teruggevonden in de lage botmassa en de verminderde botsterkte. De botten zijn stijver en kunnen slechts een beperkte hoeveelheid energie absorberen voor ze breken. Dit resulteert in botfracturen, botmisvormingen, scoliose, faciale afwijkingen en groeistoornissen. Ook typisch voor OI is het voorkomen van zogenaamde Wormiaanse botstructuren. Dit zijn extra botfragmenten in de naden van de schedel. Ten slotte worden ook de gewrichten niet gespaard. Hyperlaxiteit wordt vaak gezien bij de broze bottenziekte, zij het enkel bij de mildere vormen.(3)

2.4.2 Gehooraantasting

Gehoordaling komt vaak voor bij OI patiënten. De aantasting is meestal initieel conductief. Dit ten gevolge van fracturen van de gehoorbeentjes. Later evolueert het gehoorverlies naar een gemengde vorm waarbij zowel conductieve als neurosensoriële factoren een rol spelen. De gehoordaling is bilateraal en progressief. Hoewel ze zich meestal pas manifesteert in de tweede tot vierde levensdecade, lijdt een klein deel van de patiënten reeds vanaf kinderleeftijd aan beperkt gehoorverlies. De gehooraantasting verschilt naargelang het type van OI.(3, 14)

2.4.3 Tandafwijkingen

Osteogenesis imperfecta kan in het gebit aanleiding geven tot dentinogenesis imperfecta. De tanden zijn hierbij verkleurd. Dit kan zowel een geelbruine als een blauwgrijze kleur zijn. Andere kenmerken van de tanden bij dentinogenesis imperfecta zijn doorzichtigheid en fragiliteit. Bij histologisch onderzoek wordt abnormaal dentine teruggevonden.(3, 14)

2.4.4 Oogafwijkingen

OI patiënten kunnen blauwe sclerae hebben. Hoewel dit kenmerk ook fysiologisch kan voorkomen bij baby's of een gevolg kan zijn van een andere aandoening, wordt het vaak gebruikt om de ziekte te diagnosticeren. Er kan bovendien protrusie zijn van de ogen met een verhoogde kans op spontane en traumatische beschadiging.(14)

2.4.5 Afwijkingen in andere orgaanstelsels

De hierboven vermelde afwijkingen zijn de meest karakteristieke en frequente symptomen die bij OI worden waargenomen. Er bestaan ook nog minder vaak voorkomende manifestaties van de ziekte. Zo kunnen verschillende neurologische aandoeningen worden teruggevonden bij OI patiënten. Deze kunnen het gevolg zijn van macrocephalie¹⁹, hydrocephalie²⁰, syringomyelie²¹ en basilaire invaginatie²². Ook de longen worden niet gespaard. Frequente pneumoniecën en een *cor pulmonale*²³ worden waargenomen bij de broze bottenziekte. Deze manifestaties zijn een gevolg van de misvormingen van de thoraxwand, de ribfracturen en de scoliose van de wervelzuil, die vaak voorkomen bij OI. Uitingen van OI in het hart en bloedvatenstelsel omvatten onder andere klepinsufficiëntie, atrium septumdefecten en dilatatie van de aorta ascendens.(3, 14)

2.5 Diagnose

De broze bottenziekte wordt meestal vermoed op basis van klinische symptomen, een positieve familiale anamnese en radiografische bevindingen. Vroeger werd de diagnose voornamelijk bevestigd door biochemisch onderzoek²⁴. Met de komst van nieuwe technieken zoals desoxyribonucleïnezuur (DNA) sequencing²⁵, heeft de analyse van genetisch materiaal aan belang gewonnen als bevestigende test bij een vermoeden van OI. Hierbij wordt een moleculaire analyse verricht van het *COL1A1* en *COL1A2* gen en indien nodig van de genen die coderen voor eiwitten betrokken in het biosyntheseproces van type I collageen of de bothomeostase. Hieronder wordt een mogelijke flowchart voorgesteld bij een vermoeden van OI. Deze vangt onmiddellijk aan met een genanalyse. Volledigheidshalve kan er ook een biochemische analyse van de collageen eiwitten gebeuren om zo kwantitatieve mutaties van kwalitatieve mutaties te onderscheiden. Dit geeft immers implicaties ten opzichte van de oorzakelijke mutatie. (zie 2.6) (14, 22)

¹⁹ het hebben van een (te) groot hoofd

²⁰ aandoening waarbij in de hersenventrikels te veel hersenvocht aanwezig is

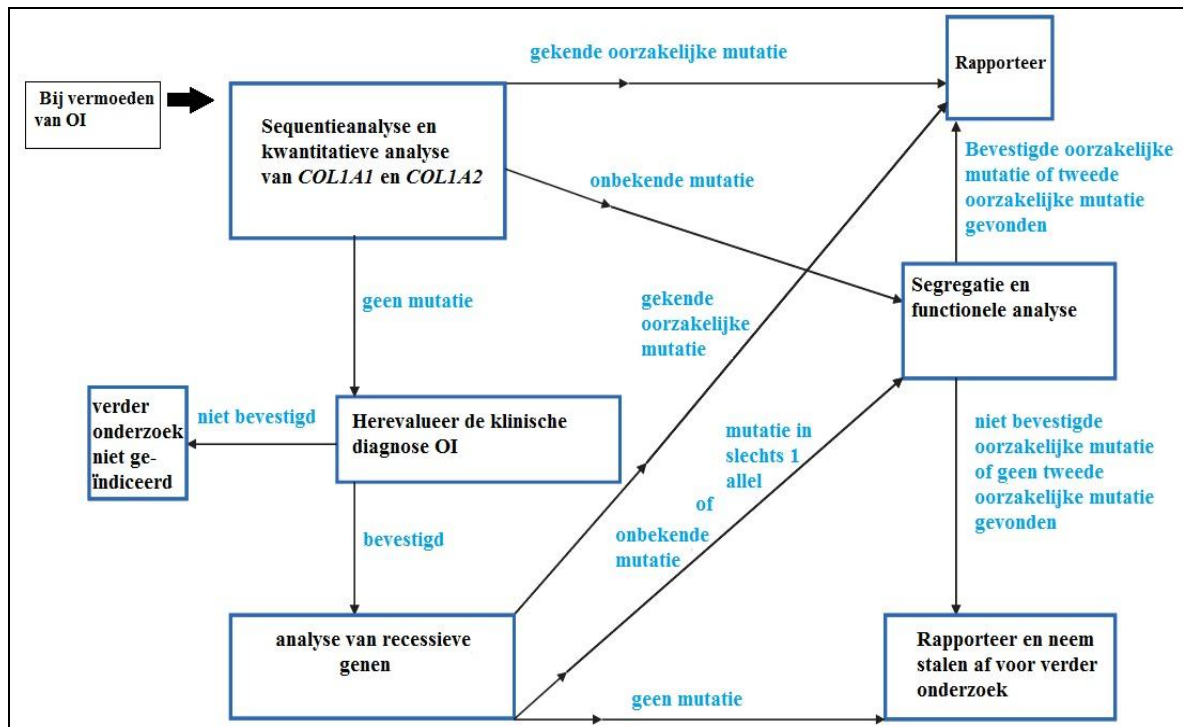
²¹ aandoening waarbij het ruggenmerg is aangetast

²² misvorming van de schedelbasis waardoor de hersenstam wordt aangetast

²³ rechter hartfalen ten gevolge van een verhoogde druk in de longen of in de bloedvaten van de longen

²⁴ evaluatie van type I procollageen ketens geproduceerd door huidfibroblasten van de patiënt

²⁵ bepalen van de volgorde van de nucleotiden in de DNA molecule



Figuur 3 Flowchart voor de bevestiging van de klinische diagnose van OI. Bij een vermoeden van OI op basis van symptomen, een positieve familiale anamnese en radiologische aanwijzingen, kan deze flowchart gevolgd worden. Deze vangt onmiddellijk aan met een genanalyse van *COL1A1* en *COL1A2*. Als er in deze genen geen causale mutatie wordt gevonden, moet de diagnose OI herzien worden. Indien men nog steeds overtuigd is van de diagnose, kan er een analyse gebeuren van de recessieve genen. Bij het vinden van een ongekeende mutatie moet er een functionele analyse gebeuren om te bevestigen of de gevonden mutatie wel aan de oorsprong ligt van het fenotype. Indien er geen mutatie wordt gevonden of er blijft onduidelijkheid omtrent de gevonden mutatie, moeten er stalen afgenomen worden voor verder onderzoek.(22)

2.5.1 Differentiaal diagnose

De mogelijke differentiaal diagnoses die gesteld kunnen worden bij OI, worden voornamelijk bepaald door leeftijd van de patiënt en de ernst van de symptomen. Een mogelijke piste die steeds in gedachte moet gehouden worden is deze van kindermishandeling. De prevalentie van dit fenomeen is veel hoger dan die van OI en deze diagnose moet dus steeds als eerste worden uitgesloten. Andere, meestal congenitale, aandoeningen die moeten worden uitgesloten zijn infantiele hypophosphatasia, Bruck syndroom, osteoporosis pseudoglioma syndroom, Cole-Carpenter syndroom, Hadju-Cheney syndroom, gerodermia osteodysplatica, idiopathische juveniele osteoporosis, dentinogenesis imperfecta zonder OI en Ehlers-Danlos syndroom.(14) Bruck Syndroom (BS) en Ehlers-Danlos syndroom (EDS) verdienen wat meer aandacht omdat ze aanleunen bij OI en, in het geval van BS, misschien een onderdeel vormen van het OI-spectrum.

Bruck Syndroom

BS is een aandoening die gekenmerkt wordt door botfragiliteit, klompvoeten²⁶ en congenitale contracturen²⁷ van de grote gewrichten met pterygia²⁸. De ziekte wordt autosomaal recessief overgeërfd. Radiografische kenmerken zijn de aanwezigheid van meerdere breuken, Wormiaanse botstructuren en gebogen lange beenderen. Er is geen dentinogenesis imperfecta noch wordt er gehoorverlies waargenomen. Er worden twee types onderscheiden, respectievelijk BS type 1 (BS1) waarschijnlijk veroorzaakt door een mutatie in het *PLOD2* gen en BS type 2 (BS2) met een causale mutatie in het *FKBP10* gen. Of deze aandoening een aparte entiteit vormt of ze deel vormt van het klinisch spectrum van OI, staat ter discussie. Meer en meer wordt de voorkeur aan de tweede denkpiste gegeven. Het voorkomen in eenzelfde gezin van een BS2 patiënt en een OI type XII patiënt, pleit hier alleszins voor. Ook het aantonen van *PLOD2*- mutaties als oorzaak van zowel BS als OI zorgt ervoor dat BS meer en meer gezien wordt als een type van OI.(10, 23, 24)

Ehlers-Danlos Syndroom

EDS is een heterogene groep van bindweefselafwijkingen die op autosomaal dominante of recessieve manier wordt overgeërfd, afhankelijk van het type EDS. Tot de karakteristieken van de aandoening behoren hypermobiliteit van de gewrichten, elastische huid die ook fragiel is en afwijkingen van de bloedvaten en ligamenten. Hiernaast worden ook scoliose, blauwe sclerae en botfragiliteit, zij het in mindere mate dan bij OI, teruggevonden waardoor de afwijking opgenomen wordt in de differentiaal diagnose van OI.(25)

²⁶ afwijkende voetstand

²⁷ blijvende samentrekking

²⁸ vleugelvorming, driehoekig membraanvorming in de nek, ogen, knieën, ellebogen of enkels (webbing)

2.6 Etiologie

2.6.1 Autosomaal Dominant overgeërfd Osteogenesis Imperfecta (AD OI)

De broze bottenziekte wordt in meer dan 90% van de gevallen autosomaal dominant overgeërfd.⁽²²⁾ Ze ontstaat meestal, met uitzondering van OI type V, ten gevolge van mutaties in de twee genen die coderen voor de α -strengen die voorkomen in type I collageen, respectievelijk *COL1A1* en *COL1A2*. De genetische defecten die worden teruggevonden, worden onderverdeeld in twee grote groepen, namelijk de kwantitatieve en de kwalitatieve mutaties. Het aantal mutaties in de collageen genen dat reeds beschreven is binnen deze groepen is legio, net als de klinische presentatievormen van OI.⁽¹³⁾

2.6.1.1 Kwantitatieve mutaties in het *COL1A1* gen en/of *COL1A2* gen

De mutaties die worden teruggevonden in deze groep leiden tot een verminderde productie van type I procollageen. Er worden twee klassen onderscheiden. Vooreerst heeft men de genetische defecten, zoals nonsense mutaties, inserties²⁹, deleties³⁰ of splice site mutaties die een frame shift veroorzaken, die plaatsvinden in één van de twee *COL1A1*-allelen. Zij geven aanleiding tot een prematuur stopcodon (PTC) in het *COL1A1*-transcript. Dit abnormale transcript zorgt op zijn beurt voor de activatie van de nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway. NMD is een soort controlemechanisme dat de kwaliteit van de mRNA transcripten controleert. De cascade leidt uiteindelijk tot de afbraak van de mutante *COL1A1*-transcripten. Het gevolg is dat er minder collageen moleculen worden aangemaakt. Dit leidt tot een tekort aan type I collageen in de ECM. Zo een mutatie wordt gezien bij OI type I.

Een tweede klasse van kwantitatieve mutaties zijn de nulmutaties³¹ die plaatsvinden in beide *COL1A1* genen, voorlopig enkel beschreven in een muismodel. Ze resulteren in een volledige afwezigheid van pro α 1(I)-strengen. Dit zorgt steeds voor intra-uteriene sterfte. Deze nulmutaties worden autosomaal recessief overgeërfd, maar worden hier besproken omwille van het feit dat ze in het *COL1A1* gen plaatsvinden. Homozygote nulmutaties in het *COL1A2* gen bestaan ook. Deze worden echter bij de kwalitatieve mutaties besproken omdat ze leiden tot de vorming van afwijkende type I collageen eiwitten.⁽³⁾

²⁹ aanwinst van één of meerdere nucleotiden

³⁰ verlies van één of meerdere nucleotiden

³¹ Mutaties die ervoor zorgen dat de functie van het gen, die normaal door de eiwitten waarvoor ze coderen wordt uitgevoerd, niet langer plaatsvindt. Dit kan bij een nulmutatie op twee manieren gebeuren. Ten eerste kan het defect ervoor zorgen dat er geen RNA-streng kan worden overgeschreven van het DNA. Een tweede mogelijkheid is dat er geen aminozuursequentie kan gevormd worden uit het mRNA. Bij de tweede manier is het niet langer uitgevoerd worden van de functie een gevolg van de vorming van een proteïne dat niet functioneel is.

2.6.1.2 Kwalitatieve mutaties in het *COL1A1* gen en/of *COL1A2* gen van type I collageen

Deze mutaties leiden tot de vorming van abnormale type I procollageen moleculen. Wanneer mutante collageen eiwitten geïntegreerd worden in de ECM kunnen ze aanleiding geven tot OI type II, III of IV. De onderliggende mutaties voor deze OI subtypes kunnen verschillend zijn en omvatten puntmutaties, *in-frame*³² duplicaties, *in-frame* deleties en splice site mutaties. De meest voorkomende zijn puntmutaties waarbij er een glycine aminozuur vervangen is door een ander aminozuur en splice site mutaties. In de groep van de kwalitatieve mutaties van type I collageen kunnen we opnieuw twee klassen van mutaties onderscheiden, namelijk de mutaties die een effect hebben op de structuur van type I procollageen en de mutaties die leiden tot het ontstaan van homotrimeren.(3)

Mutaties die invloed hebben op de structuur van type I procollageen

Een eerste categorie binnen deze klasse zijn de mutaties die plaatsvinden in het triple helix domein van type I procollageen. Ze kunnen een vertraging van de opvouwing van de procollageen strengen tot een helix induceren. Hierdoor kan er een post-translationele overmodificatie plaatsvinden waarbij de helix onnodig veel hydroxylaties en glycosylaties ondergaat. Een voorbeeld van deze categorie is de glycinesubstitutie, ten gevolge van een missense mutatie, van één van de glycine residuen in het helixdomein. Het klinische beeld verschilt naargelang de plaats waar deze glycine substitutie heeft plaatsgevonden. Wanneer deze gebeurt in de zogenaamde ‘major ligand-binding regions’³³ zijn de substituties letaal. Het aantal substituties dat aanleiding kan geven tot het letale OI type II is veel lager bij *COL1A2* in vergelijking met *COL1A1*.(3, 26)

Een tweede categorie van mutaties zorgt ervoor dat tijdens de synthese van type I collageen een probleem optreedt ter hoogte van de propeptide domeinen. Een illustratie hiervan zijn de mutaties die aanleiding geven tot substituties in het C-propeptide van de type I procollageen molecule. De alignatie van de verschillende pro- α -strengen zal verstoord zijn waardoor de helixvorming vertraagd wordt. Dit leidt eveneens tot OI. Ook het afknippen van de N-propeptides kan verstoord zijn. Een voorbeeld hiervan zijn de mutaties die leiden tot de integratie van een type I collageen molecule samen met zijn N-propeptide in de ECM. Het fenotype van deze patiënten vertoont zowel kenmerken van OI als van EDS.(3, 13, 26)

³² in het ‘leesraam’ waarin de transcriptie plaatsvindt

³³ regio’s in de collageenmolecule die kunnen interageren met andere moleculen in de extra-cellulaire matrix

Mutaties die de vorming van homotrimeren in de hand werken

Een eerste categorie hierbij zijn mutaties, onder andere missense mutaties, die leiden tot de vorming van mutante *COL1A2*-transcripten die niet worden afgebroken door NMD. De abnormale pro- $\alpha 2(I)$ -ketens die eruit vertaald worden, zullen niet geïncorporeerd worden in type I procollageen trimeren en bijgevolg worden er homotrimere type I procollageen moleculen, bestaande uit enkel pro- $\alpha 1(I)$ -ketens, gevormd. De abnormale pro- $\alpha 2(I)$ -ketens stapelen op in het intracellulaire milieu. Deze opstapeling samen met de vorming van homotrimere type I procollageen moleculen, leidt tot OI.

Mutaties in het *COL1A2* gen resulteren niet steeds in OI. Een tweede categorie zijn *COL1A2* genmutaties, onder andere nonsense mutaties, waarbij NMD wel wordt ingeschakeld. De mutante *COL1A2*-transcripten worden afgebroken en bijgevolg is er geen opstapeling van deze transcripten in de cel. Er worden echter nog steeds homotrimere type I procollageen moleculen gevormd. De patiënten vertonen een milde vorm van EDS. Het al dan niet opstapelen van mutante pro $\alpha 2(I)$ -strengen in het intracellulaire milieu blijkt dus, naast de vorming van homotrimere collageen moleculen, een cruciale rol te spelen in de bepaling van het fenotype.(3, 13, 26)

2.6.1.3 Mutaties in het *IFITM5* gen

Een van de meest recent ontdekte, maar zeldzame, oorzaken van AD OI is een mutatie in het *IFITM5* gen. Dat gen codeert voor het interferon induced transmembrane protein 5 (IFITM5). Bij deze mutatie ontstaat er een nieuw startcodon dat zich ‘stroomopwaarts’ bevindt van het eigenlijke startcodon van dit gen. Hierdoor vangt de translatie eerder aan dan gebruikelijk. Het resultaat van dit defect is een eiwit dat vijf aminozuren meer telt aan zijn N-terminus dan de niet-gemuteerde variant. Deze additie heeft geen invloed op de structuur noch op de localisatie van het IFITM5 eiwit in de cel. De specifieke pathofysiologie waardoor deze mutatie leidt tot OI type V, is nog niet volledig opgehelderd. De vijf extra aminozuren zouden een invloed hebben op de extracellulaire bindingen die het proteïne aangaat. Hierdoor kan de functie van het eiwit gestoord zijn. Verder onderzoek naar de specifieke mechanismen is nodig.(18)

2.6.2 Autosomaal Recessief overgeërfde Osteogenesis Imperfecta (AR OI)

In minder dan 10% van de gevallen wordt OI op een autosomaal recessieve manier overgeërfd. Deze vormen van OI worden niet veroorzaakt door mutaties in het *COL1A1*, *COL1A2* of *IFITM5* gen, maar wel door mutaties in genen waarvan de proteïnen een rol spelen in de biosynthese van type I collageen (zie 1.2) of in de regulatie van de bothomeostase. Vele van deze defecten zijn nonsense mutaties³⁴. Missense mutaties³⁵ en splicing defecten³⁶ kunnen echter ook voorkomen. De verschillende mutaties die voorkomen bij AR OI worden onderverdeeld in vier klassen. Dit naargelang de functie van de eiwitten waarvoor de genen coderen waarin de mutatie heeft plaatsgevonden. De eerste groep bevat de genen waarvan de producten instaan voor de herkenning en de opvouwing bij de helixvorming. Voorbeelden van deze klasse zijn *CRTAP*, *LEPRE1* en *PPIB*. De tweede klasse bevat genen die coderen voor eiwitten die instaan voor de kwaliteitscontrole van het gevormde type I procollageen. Hierin vinden we *FKBP10* en *SERPINH1* terug. De derde klasse omvat de genen waarvan de proteïnen instaan voor modificaties die op het einde van de biosynthese van type I collageen plaatsvinden en voor de vorming van de cross-links. Voorbeelden van deze groep zijn het *BMP1* en *PLOD2* gen. Tot de vierde klasse behoren de genen die coderen voor eiwitten die betrokken zijn bij de differentiatie van de cellen in het bot. *SP7*, *SERPINF1* en waarschijnlijk *TMEM38B* zijn genen die tot deze laatste klasse behoren.(3, 22) Een uitgebreide beschrijving van de oorzaken van AR OI wordt gegeven bij de resultaten.

³⁴ mutatie die leidt tot een prematuur stopcodon waardoor een verkort peptide wordt gevormd

³⁵ mutatie die leidt tot een aminozuursubstitutie waardoor de structuur van het eiwit verandert

³⁶ mutatie die leidt tot alternatieve splice sites waardoor er een verstoring van de RNA splicing optreedt

2.7 Behandeling

2.7.1 Fysiotherapie (kinesithérapie)

Kinesithérapie is een belangrijk onderdeel van de therapie. Op deze manier kan de OI patiënt zijn motoriek verbeteren. Dit is voornamelijk belangrijk tijdens de kindertijd. Een goede kinesithérapie op jonge leeftijd vergroot immers de autonomie van de patiënt op latere leeftijd.(3)

2.7.2 Medicatie

Verschillende medicamenten worden aangewend bij de behandeling van OI.

Vooreerst zijn er de bisfosfonaten. Deze verhinderen de botresorptie en kunnen de werking van de osteoclasten inhiberen. Deze klasse van medicatie heeft ook bijwerkingen. Zo worden inhibitie van botremodellering, gestoorde botgenezing en verminderde kwaliteit van het botmateriaal beschreven. Bovendien stapelt de medicatie zich gemakkelijk op in het bot, waardoor hun effecten soms langer dan gewild blijven aanhouden. Bisfosfonaten worden bijgevolg voorbehouden voor patiënten die leiden aan matige tot ernstige vormen van OI. Ze genezen de aandoening niet maar zijn complementair aan de chirurgie en fysiotherapie. De therapieduur beperkt zich meestal tot 2 à 4 jaar.(27)

Ook groeihormonen worden gebruikt in de therapie. Ze kunnen de lichaamslengte van de patiënten doen toenemen. Daarenboven bevorderen ze de botkwaliteit en kunnen ze de spiermassa en –kracht vergroten. Hun gebruik blijft echter controversieel.(3)

Ten slotte wordt er onderzoek uitgevoerd naar het gebruik van monoclonale antilichamen. Deze zouden specifieke onderdelen van de botvorming kunnen stimuleren of juist inhiberen. Voorbeelden hiervan zijn Denosumab en het anti-sclerosine antilichaam.(3)

2.7.3 Chirurgie

Orthopedische chirurgie is vaak onmisbaar in de behandeling. Osteotomieën, waarbij er in de pijpbeenderen van de patiënt vijzen worden aangebracht, worden frequent uitgevoerd. Op deze manier worden skeletale afwijkingen gecorrigeerd en wordt het aantal fracturen beperkt. Vaak is het pas mogelijk voor de patiënten om zelfstandig te wandelen na het inbrengen van de vijzen in de femur en tibia. Ook om de scoliose aan te pakken, worden metalen pinnen in de wervelzuil aangebracht. Dit wordt gedaan in combinatie met het dragen van een korset.(3, 27)

2.7.4 Nieuwe therapiemogelijkheden

Er worden volop nieuwe behandelingsmogelijkheden onderzocht. Cellulaire therapie waarbij mesenchymale stamcellen worden geïnjecteerd, beenmergtransplantatie en genterapie waarbij de gemuteerde genen worden stilgelegd, zijn maar enkele van de vele onderzoeksterreinen. Speciale aandacht gaat uit naar de chemische chaperones. Deze zouden de intracellulaire ERstress (zie resultaten 2.1) die optreedt bij OI kunnen aanpakken.(3)

2.8 Onderzoeksvraag

In de vorige hoofdstukken is een algemeen beeld geschetst van type I collageen en OI. Deze masterproef wil verder ingaan op AR OI en meer specifiek de etiologie en pathofysiologie ervan. Hiervoor wordt een literatuuronderzoek verricht naar de reeds gekende genen waarbij mutaties kunnen leiden tot OI. Ook wordt gezocht naar gemeenschappelijke mechanismen via dewelke deze mutaties tot het klinische beeld van OI kunnen leiden. Als laatste worden, aan de hand van de verkregen informatie, voorstellen gedaan omtrent andere genen die mogelijks een oorzaak kunnen vormen van OI.

Methodologie

Voor het schrijven van deze masterproef, inclusief de voorgaande inleiding, werd een literatuurstudie uitgevoerd. Dit houdt in dat verschillende artikels en boeken betreffende OI werden geraadpleegd. De informatie die uit deze bronnen werd gehaald, werd met elkaar vergeleken en geïntegreerd tot een groter geheel. Het artikel van Forlino (3), gesuggereerd door de promotor en co-promotor aan de start van dit werk, vormde de basis voor dit hele onderzoek. Door het opzoeken van de referenties van dit artikel op Web of Science³⁷, werden verschillende relevante artikels gevonden. Er werd op regelmatige tijdstippen ook eigen zoekopdrachten uitgevoerd op zowel PubMed³⁸ als Web of Science. Bij deze zoektochten werden volgende termen gebruikt in verschillende combinaties: ‘Osteogenesis Imperfecta’, ‘recessive causes’, ‘mutation’ ‘CRTAP’, ‘LEPRE1’, ‘PPIB’, ‘SERPINH1’, ‘FKBP10’, ‘SERPINF1’, ‘SP7’, ‘BMP1’, ‘TMEM38B’, ‘PLOD2’, ‘PLOD3’, ‘IFITM5’, ‘type I collagen’ en ‘ER-stress’. Er werden meerdere filters ingesteld om de meest relevante artikels te bekomen. Zo werd er voornamelijk geconcentreerd op reviewartikels en case reports die verschenen waren in de laatste vijf jaar. Ook belangrijke functionele studies over de pathogenese van de verschillende (nieuwe) OI genen werden geselecteerd. De taal werd beperkt tot Engels en Nederlands. Hierna volgt een voorbeeld van dergelijke zoekactie. Op PubMed werd volgende zoekterm ingegeven: ‘autosomal recessive osteogenesis imperfecta’. Er werden 91 artikels gevonden. Als periode werden ‘publicaties uit de laatste vijf jaar’ gekozen. Hierbij bleven nog 36 resultaten over. Als taal werd ‘Engels’ gekozen en als publicatietype ‘review’ waardoor nog 6 artikels overschoten. De impactfactor van de verschillende tijdschriften waarin de artikels verschenen, werd niet steeds nagegaan. Om op de hoogte te blijven van recente ontwikkelingen werden meerdere ‘alerts’ ingesteld op PubMed. Op deze manier werd een waarschuwing verstuurd telkens een nieuw, relevant artikel gepubliceerd werd. Behalve artikels werd ook gebruik gemaakt van het boek “*Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic, and Medical Aspects*” van Peter M. Royce en Beat Steinmann(13). Een laatste manier om informatie te vergaren was een bezoek aan het bindweefsellaboratorium van het Centrum voor Medische Genetica in de Medical Research Building (MRB) in het Universitaire Ziekenhuis van Gent. In dit laboratorium wordt zowel klinisch, biochemisch als moleculair onderzoek verricht naar erfelijke bindweefselaandoeningen zoals OI.

³⁷ <http://apps.webofknowledge.com>, toegang verkregen via Universiteit Gent

³⁸ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, toegang verkregen via Universiteit Gent

Resultaten

De opzet van deze masterproef is te onderzoeken bij welke genen een mutatie kan leiden tot AR OI. Vooreerst worden de reeds bekende AR OI genen besproken. Voorts worden de overkoepelende mechanismen beschreven via dewelke mutaties aanleiding kunnen geven tot het klinische beeld. Vervolgens worden voorstellen van mogelijke kandidaat AR OI genen weergegeven. Genen die plausibel leken maar waarbij gendefecten leiden tot een andere bindweefselaandoening worden ten slotte ook kort besproken.

1 Gekende genen waarbij een mutatie kan leiden tot AR OI

In dit hoofdstuk worden de genen weergegeven waarvan reeds is aangetoond dat mutaties aanleiding kunnen geven tot AR OI. Zowel de soort mutatie als de gevolgen ervan op de biosynthese van type I collageen worden beschreven. De gemeenschappelijke pathofysiologische mechanismen via dewelke ze aanleiding kunnen geven tot OI worden in het volgende hoofdstuk besproken. De werking van de eiwitproducten is in de meeste gevallen reeds besproken geweest bij de biosynthese van type I collageen. De functie van de proteïnen waarvan de coderende genen nog niet in de inleiding vernoemd zijn geweest, zal hieronder worden uitgelegd.

1.1 Genen die coderen voor eiwitten die post-translationele modificaties uitvoeren bij de biosynthese van type I collageen (*CRTAP*, *LEPRE1*, *PP1B*)

1.1.1 Mutaties in *CRTAP*, *LEPRE1* en *PP1B*

De meeste mutaties in het *CRTAP* gen zorgen voor een PTC dat aanleiding zal geven tot de NMD pathway. Hierbij wordt het mutante transcript afgebroken nog voor het de kans krijgt vertaald te worden in een aminozuursequentie. Bijgevolg wordt het *CRTAP*-eiwit nauwelijks of niet gevormd. De *CRTAP*-mutaties kunnen onderverdeeld worden in drie groepen. De eerste groep bevat mutaties die rechtstreeks aanleiding geven tot een PTC (nonsense mutaties). De defecten in de tweede categorie leiden tot een leesraamverschuiving (frameshift) die op haar beurt een PTC veroorzaakt. De derde en laatste groep zijn de mutaties die aanleiding geven tot een aminozuursubstitutie (missense mutaties). Het mRNA-transcript wordt hierbij niet afgebroken door de NMD maar wel vertaald tot een *CRTAP*-proteïne. Door de aanwezigheid van een ander aminozuur is de sequentie van het signaalpeptide echter gewijzigd. Bijgevolg verandert de ladingsverdeling wat leidt tot retentie van het *CRTAP*-eiwit in het rER waardoor het zijn functie niet kan uitvoeren.⁽²⁸⁾ Opmerkelijk is dat bijna alle mutaties in *CRTAP* plaatsvinden in exon 1 en 4 en de intronen waardoor ze geflankeerd worden.⁽⁷⁾

Defecten in het *LEPRE1* gen komen voor over heel de lengte van het gen. Zij kunnen eveneens worden onderverdeeld naargelang de cascade die ze activeren in de cel. De eerste en grootste groep van mutaties leidt tot de vorming van een PTC en bijgevolg de activatie van de NMD. Hierdoor is er een lage *LEPRE1*-transcriptconcentratie. Een minderheid van de gendefecten activeert de NMD pathway niet. Hierbij is er een normale concentratie aan, weliswaar abnormale, *LEPRE1*-transcripten. De P3H1-proteïnen die eruit vertaald worden zijn dysfunctioneel.(7)

Er werden reeds verschillende mutaties beschreven bij het *PPIB* gen die wederom verdeeld worden in twee categorieën. De grootste groep leidt tot een PTC en de NMD-cascade. In een klein deel van de gevallen, worden de mutante *PPIB*-transcripten toch vertaald in proteïnen. De abnormale eiwitten worden echter snel afgebroken of komen voor in een te lage concentratie om enige rol van betekenis te spelen.(29)

1.1.2 Invloed van de mutaties in *CRTAP*, *LEPRE1* en *PPIB* op de biosynthese van type I collageen

Doordat *CRTAP* of *P3H1* niet functioneel of afwezig zijn, zal het prolyl 3-hydroxylatiecomplex slecht of niet functioneren. Op deze manier wordt de 3-hydroxylatie van het Pro986 residu van de pro- α 1(I)-keten respectievelijk gereduceerd of niet uitgevoerd. Dit zorgt voor een vertraging in de triple helixvorming. Door deze vertraging kunnen bepaalde post-translationele processen zoals de hydroxylatie van lysine en proline residuen langer doorgaan en dit leidt tot een overmodificatie van de pro- α 1(I)-ketens.(7)

Bij dysfunctie of afwezigheid van *CyPB* zal er eveneens een verminderde concentratie aan 3-gehydroxyleerd Pro986 van de pro- α 1(I)-ketens zijn. Deze concentratie is echter hoger dan mutaties die leiden tot afwezigheid of sterk verminderde *LEPRE1*- of *CRTAP*-expressie. Dit toont aan dat *P3H1* en *CRTAP* essentieel zijn voor de vorming van het prolyl 3-hydroxylatiecomplex. *CyPB* is minder noodzakelijk en kan ook een onafhankelijke entiteit vormen. Het feit dat mutaties in het *PPIB* gen toch aanleiding geven tot OI doet vermoeden dat het effect van deze gendefecten verder reikt dan enkel een gestoorde 3-hydroxylatie van Pro986 van de pro- α 1(I)-keten. De *PPIB*-mutaties zouden ook invloed hebben op de chaperonefunctie en de *cis-trans* isomerisatieactiviteit van het prolyl 3-hydroxylatiecomplex.(29)

Belangrijke opmerking hierbij is dat afhankelijk van het type mutatie, het pathofysiologisch mechanisme kan verschillen en bijgevolg verschillende klinische manifestaties van eenzelfde OI-type mogelijk zijn.

1.2 Genen die coderen voor chaperone-eiwitten (*SERPINH1*, *FKBP10*)

1.2.1 Mutaties in *SERPINH1* en *FKBP10*

Mutaties in het *SERPINH1* gen resulteren in de vorming van een mutant transcript. Deze abnormale transcripten leiden niet tot NMD, maar zullen vertaald worden tot een mutant HSP47 eiwit dat snel proteasomale degradatie ondergaat. Aldus, leidt dit tot een lage concentratie aan HSP47 in de cel.(30)

Er werden reeds verschillende mutaties beschreven in het *FKBP10* gen. De meeste leiden tot activatie van de NMD cascade.

1.2.2 Invloed van mutaties in *SERPINH1* en *FKBP10* op de biosynthese van type I collageen

De verminderde aanwezigheid van het HSP47-eiwit heeft geen invloed op de totale hoeveelheid type I procollageen dat aangemaakt wordt. Ook de post-translationele modificaties van type I procollageen verlopen normaal. Er is echter wel een versneld transport van type I procollageen moleculen van het rER naar het Golgi apparaat. De tijd die ze in het intracellulaire milieu spenderen is daarentegen verlegd. Ze worden dus trager gesecreteerd naar de ECM. Een ander gevolg van de verminderde HSP47 concentratie is een gewijzigde conformatie van de type I procollageen proteïnen waardoor ze vatbaarder worden voor afbraak door proteasen. Met andere woorden de kwaliteitsgarantie, die normaal door HSP47 wordt uitgevoerd ter hoogte van de overgang rER-Golgi, ontbreekt. Een laatste manier waarop de biosynthese van type I procollageen kan beïnvloed worden door *SERPINH1* mutaties, is de vorming van abnormale collageenfibrillen.(30)

FKBP10 mutaties zorgen voor een dysfunctioneel of afwezig FK506 binding protein, waardoor dit eiwit zijn chaperonetaak niet kan uitvoeren. Dit zorgt op zijn beurt voor een verstoorde secretie van type I procollageen. Er ontstaan aggregaten van type I procollageen in het rER, wat resulteert in de dilatatie van het rER. Bovendien zal de PPIase activiteit van het FK506 binding protein aangetast zijn. Dit heeft echter minder grote gevolgen daar deze activiteit voornamelijk wordt uitgevoerd door het CyPB. Net zoals bij *SERPINH1* gendefecten, zullen mutaties in het *FKBP10* gen geen invloed hebben op de hoeveelheid type I procollageen die gesynthetiseerd wordt. Het aantal type I procollageen moleculen dat gesecreteerd wordt, en dus de uiteindelijke hoeveelheid beschikbaar type I collageen proteïne in de ECM, zal echter wel verminderd zijn ten gevolge van de mutatie.(31)

1.3 Genen die coderen voor proteïnen die instaan voor de maturatie van type I collageen en voor de vorming van de cross-links (*BMP1*, *PLOD2*)

1.3.1 Functie van *BMP1*

De familie van de BMP1/TLD-like proteïnases bestaat uit vier verschillende eiwitten die gecodeerd worden op 3 verschillende loci. Bone morphogenetic protein 1 (BMP1) en mammalian Tolloid protein (mTLD), gelocaliseerd op dezelfde locus, zijn alternatieve splice producten van het *BMP1* gen. Vervolgens is er Tolloid-like protein 1 (TLL1) op chromosoom 4 en ten slotte Tolloid-like protein 2 (TLL2) op chromosoom 10. Deze vier proteïnen kunnen allen het C-terminale propeptide van type I procollageen verwijderen. De efficiëntie waarmee ze dit doen verschilt echter. BMP1 vertoont de sterkste endopeptidase activiteit gevolgd door mTLD. TLL1 en TLL2 vertonen beiden een lage procollageen I C-terminale propeptide (PICP) protease activiteit.⁽²⁰⁾ Deze familie van eiwitten zou ook betrokken zijn bij de activatie van het LOX-enzyme, dat noodzakelijk is voor de cross-linking tussen de verschillende collageen moleculen in de collageen fibrillen.⁽²⁰⁾

1.3.2 Mutaties in *BMP1* en *PLOD2*

Tot op heden is één mutatie in het *BMP1* gen beschreven die aanleiding geeft tot OI. Deze zorgt voor de aanmaak van een mutant BMP1- en mTLD-proteïne. Deze mutante eiwitten worden niet afgebroken door het proteasoom³⁹ en komen in de ECM terecht.⁽²⁰⁾

Er werden reeds verschillende mutaties in het *PLOD2* gen beschreven. Die mutaties die leiden tot het ontstaan van een PTC, activeren de NMD-cascade. Voor *PLOD2* bestaan er twee vormen van het eiwitproduct (LH2): 'LH2(lang)' en 'LH2(kort)'. Bij mutaties kan de synthese van LH2(lang) gestoord zijn maar deze van LH2(kort) behouden blijven. Dit kan echter een klinische manifestatie van de mutatie, met andere woorden een OI fenotype, niet voorkomen.⁽²⁴⁾

³⁹ eiwitcomplex dat overbodige of beschadigde proteïnen afbreekt

1.3.3 Invloed van mutaties in *BMP1* en *PLOD2* op de biosynthese van type I collageen

De missense mutatie in het *BMP1* gen vindt plaats in het katalytisch domein. Bijgevolg kan het BMP1 eiwit zijn enzymatische functie niet langer uitvoeren. Hierdoor worden type I pC-collageen moleculen, type I collageen waaraan het C-propeptide nog is vastgehecht, geïntegreerd in de fibrillen en komen zo in de ECM terecht. De enzymatische splitsing valt echter niet helemaal weg. Immers TLL1 en TLL2 kunnen deze activiteit, zij het in beperkte mate, overnemen. Ook andere substraten van BMP1 en mTLD zullen invloed ondervinden van de gestoorde propeptide protease activiteit. Zo zou de activatie van het LOX zymogeen gestoord zijn. Er waren al aanwijzingen dat *BMP1* wel eens een oorzaak van OI kon zijn. Immers wanneer er een mutatie plaatsvindt in de regio van het *COL1A1* en *COL1A2* gen die codeert voor de 'cleavage site', waar de BMP1/TLD-like proteinases moeten knippen, ontstaat AD OI. Deze vorm is echter minder ernstig dan het AR OI type XIII dat wordt uitgelokt door mutaties in het *BMP1* gen.(20)

Mutant LH2(lang) kan de hydroxylatie van lysyl residuen in het telopeptidedomein van het type I procollageen niet uitvoeren. Hierdoor kunnen de suikergroepen niet meer naar de lysyl aminozuren getransfereerd worden. Daarenboven zal de vorming van de cross-links bij het de fibrilvorming verstoord zijn. Hierdoor verliezen de fibrillen hun stevigheid en trekvastheid.(24) Bij het afwezig zijn of slecht functioneren van LH2, ontstaat een fenotype dat varieert tussen OI en BS, analoog aan wat geobserveerd wordt bij *FKBP10* mutaties. Via welke mechanismen dit precies gebeurt, is nog niet bekend. Vermits er reeds contracturen aanwezig zijn van bij de geboorte, wordt vermoed dat hydroxylatie van lysyl residuen een rol speelt in de prenatale vorming van de gewrichten.(10, 24)

1.4 Genen die coderen voor eiwitten die een functie hebben bij het reguleren van de bothomeostase (*SERPINF1*, *SP7*, *TMEM38*)

1.4.1 Functie van *SERPINF1*, *SP7* en *TMEM38B*

Het *SERPINF1* gen codeert voor het pigment epithelium-derived factor (PEDF)-eiwit. PEDF speelt een belangrijke rol in verschillende processen in de bothomeostase. Ten eerste kan het de maturatie van osteoclasten inhiberen door de productie van osteoprotogerine te stimuleren. Deze zal het RANK-ligand blokkeren en zo de proliferatie en differentiatie van osteoclastprecursoren verminderen. Een tweede functie van PEDF is de regulatie van de mineralisatie van het osteoïd⁴⁰. Ten derde kan PEDF ook de effecten van de vasculaire endotheliale groeifactor (VEGF) tenietdoen. VEGF staat onder andere in voor de migratie van osteoblasten en osteoclasten. Een vierde en laatste rol die PEDF speelt is in de celadhesie, het kan namelijk de interactie tussen type I collageen en $\alpha 1\beta 1$ - of $\alpha 1\beta 2$ -integrine beïnvloeden.(32)

Het *SP7* gen codeert voor de transcriptiefactor Osterix, welke een essentiële rol speelt in de differentiatie van osteoblasten en de botvorming in het algemeen.(33)

Het *TMEM38B*-eiwit is een trimeer intracellulair Ca^{2+} -cation kanaal (TRIC) dat de intracellulaire concentratie van calcium kan moduleren.(21)

1.4.2 Mutaties in *SERPINF1*, *SP7* en *TMEM38B*

De gendefecten in *SERPINF1* die reeds ontdekt zijn leiden allen tot een PTC. De abnormale transcripten ondergaan vervolgens de NMD.(32)

Er is tot op heden slechts 1 mutatie beschreven in het *SP7* gen die aanleiding geeft tot OI. Het betreft een deletie die leidt tot een PTC en de vorming van een mutant transcript. Deze transcripten worden echter niet afgebroken via het NMD. Ze worden vertaald tot abnormale Osterix proteïnen, welke grotendeels afgebroken worden door het proteasoom. Door de mutatie wordt er dus een gereduceerde hoeveelheid Osterix gevormd. Bovendien hebben de Osterix eiwitten die ontsnapt zijn aan de proteasomale degradatie een gestoorde functie en kunnen ze hun activiteit als transcriptiefactor niet correct uitoefenen.(33)

Mutaties in het *TMEM38B* gen, waarbij exon 4 verloren gaat, zijn pas recentelijk aangetoond als mogelijke oorzaak van AR OI.(21)

⁴⁰ Osteoïd is een eiwitmengsel dat uitgescheiden wordt door osteoblasten. Als het mineraliseert, wordt het botweefsel. Het mengsel bevat vooral type I collageen, glycosaminoglycanen en proteoglycanen.

1.4.3 Invloed van mutaties in *SERPINF1*, *SP7* en *TMEM38B* op de bothomeostase

De gendefecten in *SERPINF1* leiden allen tot de afwezigheid van het PEDF-eiwit. PEDF heeft echter geen rechtstreeks invloed op de biosynthese van type I collageen. Op welke manier de afwezigheid van PEDF dan toch tot OI kan leiden, is nog niet opgehelderd.(32) Osterix is, net zoals PEDF, niet rechtstreeks betrokken bij de biosynthese van type I collageen maar kan wel de transcriptie van *COL1A1* en *COL1A2* stimuleren. Daar *SP7* enkel tot expressie gebracht wordt in corticale osteoblasten, bepaalde chondrocyten en trabeculaire osteoblasten, zullen andere bindweefsels, die deze cellen niet bevatten, minder of geen hinder ondervinden van de mutatie. Er is echter nood aan verder onderzoek om uit te klaren hoe mutaties in transcriptiefactoren, die specifieke regulators zijn voor de genexpressie van osteoblasten, kunnen leiden tot OI.(33)

Bij muisstudies is aangetoond dat *TMEM38B* deficiëntie leidt tot alveolaire pathologie en een gestoorde werking van de hartspiercellen. Hoe een mutatie in het *TMEM38B* gen kan leiden tot botafwijkingen is nog niet geweten.(21)

2 Pathofysiologie

Bij een mutatie die aanleiding geeft tot OI zijn er drie zaken die beschouwd moeten worden:

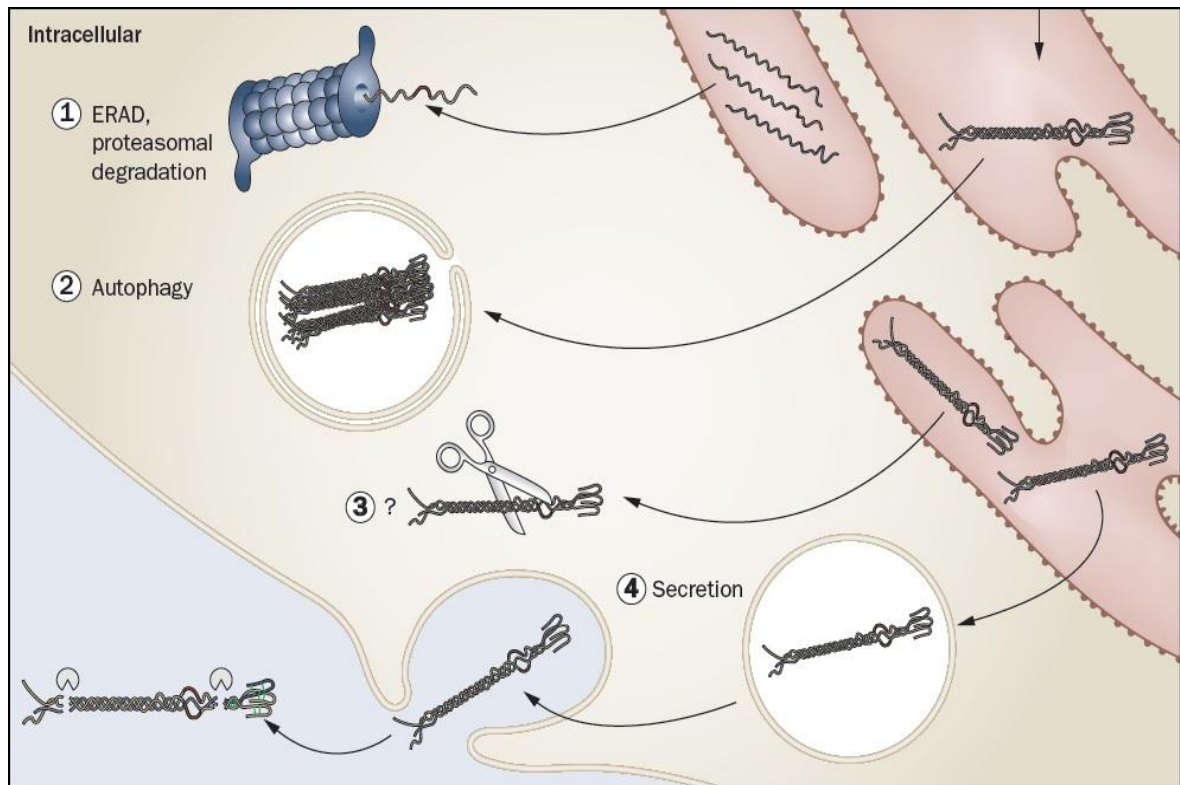
1. de specifieke kenmerken van de mutatie zelf (zie 1).
2. de invloed van de mutatie op de biosynthese van type I collageen of op de bothomeostase (zie 1).
3. de dysfunctie ter hoogte van de ECM en de bijbehorende bindweefsels die aanleiding geeft tot het kenmerkende OI-fenotype.

Aldus blijkt dat de pathofysiologie van OI niet mag gereduceerd worden tot uitsluitend het rechtstreekse gevolg van de mutatie zelf, maar dat de mutatie in een bredere context dient bekeken te worden. Immers verschillende soorten gendefecten kunnen aanleiding geven tot een gelijkaardig klinisch OI-beeld, wat impliceert dat er gemeenschappelijke pathofysiologische mechanismen bestaan.(3) De reeds onderzochte gemeenschappelijke processen worden hierna besproken. De exacte pathofysiologische mechanismen en hun bijdrage dienen echter nog verder in detail onderzocht te worden. Tevens zijn er nog bijkomende mechanismen die nog niet ontdekt zijn.

2.1 ER-stress

2.1.1 Inleiding

De synthese van eiwitten is een complex multistap-proces. Om eventueel fout opgevouwen eiwitten vroegtijdig te detecteren heeft de cel veel controle- en correctiemechanismen ingebouwd. Een eerste controleproces is NMD (zie 2.6.1.1) dat zorgt voor de afbraak van mRNA transcripten die een PTC bevatten. Dit proces vindt plaats op pre-mRNA niveau. Er zijn echter ook controlemechanismen die ingrijpen nadat de translatie heeft plaatsgevonden. Zij zorgen ervoor dat enkel correct opgevouwen eiwitten de cel verlaten. Ophoping van slecht opgevouwen, al dan niet mutante, proteïnen in het ER (ER-stress) activeert deze controlemechanismen.(3)



Figuur 4: Controlemechanismen die geactiveerd kunnen worden door ER-stress. Bij de ophoping van slecht of niet opgevouwen eiwitten kunnen verschillende pathways geïnitieerd worden. Deze pathways zorgen ervoor dat enkel correct opgevouwen eiwitten de cel verlaten. Een eerste controlemechanisme is de UPR. Deze leidt onder andere tot de afbraak van slecht opgevouwen eiwitten door ERAD (cijfer 1). APR is een ander mechanisme. Het leidt tot autofagie en lysosomale afbraak van de aggregaten van abnormale eiwitten (cijfer 2). Er bestaan ook nog onbekende controlemechanismen die meehelpen om de kwaliteit van de gevormde eiwitten te garanderen (cijfer 3). Een laatste mogelijkheid is dat slecht opgevouwen eiwitten ontsnappen aan de verschillende controlemechanismen en toch gesecreteerd worden (cijfer 4). Incorporatie van deze abnormale eiwitten in de ECM zorgt voor dysfunctie.(3)

2.1.2 Unfolded Protein Response (UPR)

De meest onderzochte van deze mechanismen is de UPR. Hoofdrolspelers in de processen die plaatsvinden bij de UPR zijn binding immunoglobulin protein (BiP), inositol-requiring enzyme-1 (IRE-1), het pancreatic ER eukaryotic translation initiation factor 2a kinase (PERK) en de activating transcription factor-6 (ATF6). De laatste drie eiwitten, namelijk IRE-1, PERK en ATF6, zijn ER-stress transducers. Dit zijn transmembranaire eiwitten van het ER die gevoelig zijn aan ER-stress. In normale toestand zijn zij gebonden aan het BiP-eiwit en zijn ze inactief. Bij ER-stress zal BiP de ER-stress transducers loslaten om zich te binden aan de slecht en niet opgevouwen proteïnen. De ER-stress transducers worden nu actief en starten elk een cascade:

1. IRE-1 zorgt voor een hogere expressie van de genen die coderen voor chaperone-eiwitten en van de genen waarvan de producten instaan voor de endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD).
2. PERK start een cascade die onder andere leidt tot de expressie van het CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) die tot de apoptose van de cel kan leiden.
3. ATF6 zorgt voor een verhoogde aanmaak van zowel chaperone-eiwitten als van CHOP.

Het resultaat is dat de synthese van de meeste eiwitten wordt verminderd of stilgelegd, de productie van BiP en andere chaperone-eiwitten wordt gestimuleerd en de slecht opgevouwen eiwitten via het ERAD-mechanisme worden afgebroken. UPR wordt onder andere geactiveerd bij AD OI vormen waarbij de mutatie zich bevindt in het globulaire C-propeptide domein.(11, 34)

2.1.3 Aggregated protein response (APR)

Bij bepaalde mutaties in *COL1A1*, *COL1A2* en *SERPINH1*, wordt de UPR niet geactiveerd. De slecht opgevouwen type I procollageen proteïnen aggregeren tot grote, onoplosbare klusjes die ER-stress veroorzaken. Vervolgens wordt een mechanisme geactiveerd dat leidt tot autofagie en lysosomale afbraak van de aggregaten. Dit mechanisme wordt de ‘aggregated protein response’ (APR) genoemd. Deze benaming is echter nog niet internationaal aanvaard. De exacte mechanismen van deze APR zijn nog niet volledig opgehelderd.(11)

2.1.4 Onbekende pathways

Er zijn nog andere controlemechanismen die mutante eiwitten kunnen opruimen. De cascades die ze initiëren leiden tot de degradatie van deze abnormale proteïnen. Hoe ze uitgelokt worden of welke eiwitten een rol spelen is voorlopig nog niet geweten. Voorbeelden hiervan zijn de afbraak van pro- $\alpha 2(I)$ -ketens bij knockout mutaties van *COL1A1* en de afbraak van bepaalde mutante type I procollageen moleculen.(3, 11)

2.1.5 Apoptose

De bovenvermelde mechanismen dienen om de homeostase in de cel snel te herstellen. Bij het wegwerken van de abnormale proteïnen en het normaliseren van de stress in het ER, worden deze terug uitgeschakeld. Wanneer de ER-stress blijft aanhouden blijven deze mechanismen continu actief. Dit heeft als mogelijke consequentie dat er CHOP-gemedieerde apoptose van de cel optreedt.(34)

2.2 Dysfunctionele ECM en mineralisatie

Bot bestaat uit botcellen die een ECM secreteren. De botcellen worden onderverdeeld in cellen die belangrijk zijn voor de botvorming, namelijk osteoblasten en osteocyten, en cellen die belangrijk zijn bij de botafbraak, namelijk osteoclasten. In de ECM wordt een organisch deel onderscheiden, dat bestaat uit type I collageen en niet-collagene eiwitten (osteonectine, proteoglycanen, fibronectine,...), en een anorganisch deel dat bestaat uit calcium en fosfaat. De afzetting van calcium en fosfaat op het organische deel van de ECM wordt mineralisatie genoemd.(35)

Bij OI wordt een dysfunctionele ECM en mineralisatie gezien. Deze dysfunctie is meestal het gevolg van een samenspel van factoren. Zo is er de heterogeniteit van de matrix. Er bevinden zich immers zowel mutante als normale type I collageen eiwitten in de ECM. Ook de verstoorde interactie tussen de mutante fibrillen en de niet-collagene eiwitten van de ECM speelt een rol. Ten slotte zal de samenstelling van het niet-collagene eiwitdeel van de ECM veranderd zijn. Zo zal bijvoorbeeld de concentratie van osteonectine verminderd zijn terwijl deze van fibronectine verhoogd zal zijn. Al deze factoren samen zorgen voor een abnormale architectuur van de ECM van het bot. Dit beïnvloedt de concentratie aan cytokines en groeifactoren die nodig zijn voor de differentiatie van de precursoren van osteoblasten en osteoclasten, alsook de mineralisatie van de botmatrix. Daar de mineralisatie rechtstreeks in verband staat met de fragiliteit van het bot, kan een verstoring ervan de typische botbreuken bij OI verklaren.(3)

2.3 Verstoorde cel-matrix en cel-cel interacties

De differentiatie van de osteoblast precursoren in OI is verstoord ten gevolge van abnormale concentratie aan cytokines en groeifactoren (zie 2.2) en door een tekort aan cross-links bij de fibrilvorming bij OI. Interactie van osteoblast precursoren met een cross-link-arme matrix houdt immers hun differentiatie tegen. Daarbij zal een laag aantal cross-links zorgen voor een verhoogde rekrutering van osteoclasten en zullen immature osteoblasten de aanmaak en differentiatie van osteoclast precursoren stimuleren. Algemeen leiden de verstoorde cel-matrix en cel-cel interacties tot een verhoogde osteoclastactiviteit en een verminderde osteoblastfunctie. Dit zorgt voor een verhoogd botmetabolisme waarbij er meer bot wordt geresorbeerd dan dat er bot gevormd wordt door de osteoblasten. Dit kan de geobserveerde botzwakte bij OI verklaren.(3, 11)

3 Kandidaatgenen waarbij mutaties mogelijks OI zouden kunnen veroorzaken

Hoewel er in de laatste jaren een enorme vooruitgang is geboekt in het onderzoek naar de etiologie van OI, zijn er nog steeds OI-patiënten die genetisch onopgehelderd zijn. In deze masterproef worden een aantal kandidaatgenen voorgesteld. De criteria waarop deze kandidaatgenen geselecteerd zijn, zijn vrij ruim. De pathofysiologie toont immers aan dat mutaties in verschillende genen via gemeenschappelijke mechanismen aanleiding kunnen geven tot een gelijkaardig klinisch beeld. Omdat een eindeloze opsomming van alle mogelijke kandidaten echter onmogelijk was, werd er beperkt tot genen van eiwitten die worden geproduceerd door cellen die een rol vervullen in de bothomeostase. Er werd gefocust op proteïnen die door hun rol in de biosynthese van type I collageen of in de ER-stress cascade, een voor de hand liggende kanshebber zijn. Of de voorgestelde genen daadwerkelijk een OI-beeld kunnen veroorzaken, zal door verder onderzoek moeten uitgewezen worden.

3.1 P4H

P4H vervult een belangrijke rol in de biosynthese van type I collageen. Bij dysfunctie of afwezigheid van dit eiwit wordt een verminderde concentratie aan 4-hydroxyproline residuen verwacht. Bijgevolg kunnen de intramoleculaire waterstofbruggen niet gevormd worden en zullen de collageen moleculen denatureren bij temperaturen lager dan 37° Celsius. Door deze stabiliserende functie in de triple helix, vormt het *P4H* gen een geschikte kandidaat.(30)

3.2 PDI

PDI vervult zowel een stabiliserende als een chaperonerende rol bij de biosynthese van type I collageen en vormt bovendien een onderdeel van het P4H eiwit. Naar analogie met de eiwitten die gelijkaardige functies uitvoeren en reeds aangetoond zijn als veroorzaker van AR OI, wordt PDI naar voor geschoven als mogelijke kandidaat.(30)

3.3 Protein-lysine 6-oxidase

Bij dysfunctie van dit enzyme wordt verwacht dat de vorming van cross-links gestoord is waardoor de fibrillogenese niet correct kan plaatsvinden. De trekvastheid van de type I collageen fibrillen zal hierdoor verloren gaan. Om deze reden wordt het *LOX* gen als kanshebber voorgesteld.(2)

3.4 Bip, Calnexine, GRP94 en andere aspecifieke chaperone-eiwitten

Er bestaat een hele groep aan proteïnen die een algemene chaperonefunctie uitvoeren. Ze zijn niet specifiek voor de biosynthese van type I collageen, maar komen er wel bij aan bod. Of mutaties in de genen die voor deze eiwitten coderen, kunnen leiden tot een klinisch beeld van OI dan wel onverenigbaar zijn met leven, moet onderzocht worden.(11, 31)

4 Kandidaatgenen waarbij mutaties leiden tot andere bindweefselaandoeningen

Er werden ook kandidaatgenen onderzocht die reeds betrokken bleken te zijn bij een andere bindweefselaandoening. Hun eiwitproducten spelen weliswaar een rol in de biosynthese van type I collageen maar mutaties in deze genen leiden niet tot OI. Ze leiden echter wel tot andere erfelijke bindweefselziekten die verwant of overlappend met OI zijn, zoals onder andere EDS.

4.1 *PLOD1*

Mutaties in het *PLOD2* gen zijn reeds aangetoond als mogelijke oorzaak van AR OI. Daar de hydroxylatie van lysine residuen bij de biosynthese van type I collageen door zowel LH2 als LH1 wordt uitgevoerd, lijkt het coderende gen van LH1, namelijk *PLOD1*, ook een mogelijke kandidaat.

Mutaties in het *PLOD1* gen resulteren echter niet in AR OI maar in EDS type VIA, dat eveneens AR wordt overgeërfd. Door de mutatie zal het LH1-enzyme dysfunctioneel zijn en zijn werking niet meer kunnen uitvoeren. Hierdoor zal er slechts een beperkt aantal lysine residuen in de triple helix gehydroxyleerd worden. Bijgevolg zal ook de glycosylatie van de triple helix verstoord zijn net zoals de fibrilvorming. Deze effecten worden ook gezien bij *PLOD2* mutaties maar leiden daar tot een ander klinisch beeld. Of de hydroxylatie in het triple helixdomein dan wel in het telopeptidedomein gestoord is, blijkt dus een belangrijke invloed te hebben op het fenotype.

EDS VIA wordt gekenmerkt door hypotone spieren bij de geboorte, een fluweelachtige huid, kyphoscoliose en hyperlaxiteit van de gewrichten.(10, 36)

4.2 *PLOD3*

Functie

Het *PLOD3* gen codeert voor het LH3-eiwit. LH3 staat, net zoals LH1 en LH2, in voor de hydroxylase van lysine residuen. LH3 vervult echter nog een extra functie. Het kan assisteren bij het plaatsen van suikergroepen op de procollageen moleculen en heeft dus een glucosyl- en galactosyltransferaseactiviteit.(37)

Mutaties

Er is reeds één mutatie beschreven in het *PLOD3* gen in een complex en ernstig bindweefselfenotype, dat overlap met OI vertoont. De beschreven mutatie veroorzaakt een PTC maar activeert de NMD niet. Bijgevolg wordt een mutante vorm van LH3 geproduceerd die dysfunctioneel is.

Bij *PLOD3* gen mutaties zijn zowel de lysyl hydroxylase activiteit als de transferaseactiviteit van glucosyl- en galactosylgroepen, die beiden plaatsgrijpen in het triple helixdomein, gestoord. Voornamelijk de transferasefunctie van LH3 is cruciaal voor een normale ontwikkeling. De hydroxylasefunctie van het eiwit kan immers (deels) overgenomen worden door LH1 en LH2. De biosynthese van type I collageen is niet de enige die beïnvloed wordt door een dysfunctie van het LH3. Ook bij de vorming van andere collageen types zullen er zware problemen optreden.

Indien LH3 volledig afwezig is, resulteert dit in uteriene sterfte van het embryo. Bij een beperkte werking van het enzyme, zal het fenotype een combinatie zijn van kenmerken van verschillende bindweefselaandoeningen, waaronder ook OI. Zo passen een platte facies, myopie en prominente kniegewrichten bij de diagnose van Stickler syndroom. Osteopenie, een spontane ruptuur van de bloedvaten en huidafwijkingen daarentegen worden eerder bij EDS gezien. Groeiachterstand en fractures horen dan weer bij BS en OI. Bovendien zijn er symptomen die niet onder te brengen zijn bij een reeds gekende bindweefselafwijking. Er kan geconcludeerd worden dat *PLOD3*-mutaties niet leiden tot enkel een klinisch beeld van OI maar wel tot een complex fenotype dat karakteristieken van verschillende bindweefselaandoeningen omvat.(37)

4.3 ADAMTS2

Mutaties in het *BMP1* gen, waarvan de eiwitproducten instaan voor de PICP-proteaseactiviteit, kunnen leiden tot OI. In analogie hiermee zouden mutaties in het *ADAMTS2* gen, dat codeert voor het N-proteïnase, een gelijkaardig beeld kunnen veroorzaken.

Gendefecten in *ADAMTS2* leiden echter tot EDS, meer bepaald EDS type VIIC. Dit kon verwacht worden omdat mutaties in *COL1A1* en *COL1A2* die leiden tot een abnormale N-propeptide 'cleavage sequentie', ook leiden tot respectievelijk EDS type VIIA en type VIIB.(36)

EDS type VIIC wordt onder andere gekenmerkt door extreme fragiliteit van de huid, hyperlaxiteit van de gewrichten en blauwe sclerea. De huid lijkt meer aangetast dan de andere organen. De andere weefsels bevatten waarschijnlijk enzymen die de N-proteïnasefunctie (gedeeltelijk) kunnen overnemen.(25)

Discussie en conclusie

De opzet van deze masterproef was de etiologie en pathofysiologie van AR OI te onderzoeken aan de hand van een literatuurstudie. Op basis van case studies, review artikels, wetenschappelijke boeken omtrent de materie en een bezoek aan het MRB labo werd geprobeerd om een zo duidelijk mogelijk antwoord te geven op de volgende drie vragen:

1. Wat zijn de reeds gekende genen waarbij mutaties kunnen leiden tot AR OI?
2. Wat zijn de gemeenschappelijke mechanismen via dewelke deze mutaties leiden tot het klinische beeld van OI?
3. Welke ongekende genen zouden mogelijks een oorzaak kunnen vormen van OI bij mutatie? En indien een mutatie in een voorgesteld gen niet leidt tot OI, tot welke bindweefselaandoening dan wel?

Eerste vraag

Als antwoord op de eerste vraag werden 10 verschillende genen teruggevonden. Deze konden gecategoriseerd worden in 4 groepen.

De eerste groep omvat de genen waarvan de proteïnen instaan voor de uitvoering van de post-translationele modificaties bij de biosynthese van type I collageen. Hiertoe worden *CRTAP*, *LEPRE1* en *PPIB* gerekend. Mutaties in deze genen leiden meestal tot een PTC en de activatie van de NMD. Hierdoor kan het prolyl 3-hydroxylatiecomplex slecht of niet functioneren en bijgevolg wordt de 3-hydroxylatie van het Pro986 residue van de pro- α 1(I)-keten respectievelijk gereduceerd of niet uitgevoerd. Daarbij wordt opgemerkt dat een dysfunctie van *PPIB* minder ernstige gevolgen heeft dan een dysfunctie van de twee andere componenten van het complex.

Een tweede klasse bevat de genen waarvan de eiwitten dienst doen als chaperone-eiwit bij de aanmaak van type I collageen. Voorbeelden van deze klasse zijn *FKBP10* en *SERPINH1*. Gendefecten in deze groep zorgen onder andere voor een verstoring van het intracellulaire transport en voor een gebrekkige kwaliteitsgarantie van de gevormde type I procollageen moleculen. Bovendien kunnen mutaties in *FKBP10* zowel tot OI als tot BS2 leiden, hetgeen doet vermoeden dat BS een onderdeel vormt van het OI-spectrum.

Een derde groep genen codeert voor proteïnen die de modificaties op het einde van de biosynthese van type I collageen uitvoeren, met name het afknippen van het C-propeptide en maken de vorming van de cross-links mogelijk. *BMP1* en *PLOD2* behoren tot deze groep. Bij mutatie van *BMP1* valt slechts een deel van de enzymatische splitsing van het C-propeptide weg, immers andere leden van deze proteasefamilie kunnen de activiteit, zij het in beperkte mate, overnemen. Gendefecten in *PLOD2* zorgen ervoor dat suikergroepen niet meer aan de lysyl residuen gehecht kunnen worden en dat er een verstoorde vorming is van cross-links bij de fibrilvorming waardoor ze hun stevigheid en trekvastheid verliezen. Daarenboven leidt een dysfunctie van LH2 tot een fenotype dat varieert tussen OI en BS, analoog aan wat geobserveerd wordt bij *FKBP10* mutaties.

De eiwitproducten van de vierde en laatste groep van genen hebben geen rechtstreekse invloed op de biosynthese van type I collageen maar spelen wel een rol in de bothomeostase. In deze groep worden *SERPINF1*, *SP7* en *TMEM38B* teruggevonden. Behalve hun rol in de bothomeostase is er echter weinig geweten over deze genen. Verder onderzoek is noodzakelijk om de specifieke effecten van mutaties in deze genen in relatie tot OI op te helderen.

Tweede vraag

Er werden (reeds) vier verschillende mechanismen teruggevonden die een antwoord bieden op de tweede vraag. Vooreerst is er de NMD, een controlemechanisme dat de kwaliteit van de mRNA transcripten controleert. Wanneer bepaalde mutante transcripten gevormd worden, zorgt de NMD voor hun afbraak. Bijgevolg worden er minder moleculen vertaald wat leidt tot een tekort aan bepaalde eiwitten, bijvoorbeeld type I collageen, in de ECM. Een tweede mechanisme zijn de verschillende cascades die door ER-stress geïnitieerd kunnen worden. Door ophoping van slecht of niet opgevouwen eiwitten in het ER worden de UPR, APR of andere, nog onbekende, pathways geactiveerd. Indien deze ER-stresscascades continu aanhouden, kan zelfs apoptose van de cel plaatsvinden. Als derde oorzaak is er de dysfunctionele ECM en mineralisatie. Deze dysfunctie is meestal het gevolg van een samenspel van factoren zoals de heterogeniteit van de matrix, de verstoorde interactie tussen de mutante fibrillen en de niet-collagene eiwitten van de ECM en de veranderde samenstelling van het niet-collagene eiwitdeel van de ECM. Hierdoor zal de concentratie aan cytokines en groeifactoren gewijzigd zijn wat effect heeft op de mineralisatie en dus de fragiliteit van het bot.

Ten slotte zullen de verstoorde cel-cel en cel-matrix interacties een vierde pathofysiologisch mechanisme vormen. De verstoorde interacties zorgen voor een verhoogde osteoclastactiviteit en een verminderde osteoblastfunctie. Dit leidt tot een verhoogd botmetabolisme waarbij er meer bot wordt geresorbeerd dan dat er bot kan gevormd worden met als gevolg een manifeste botzwakte. Hierbij moet opgemerkt worden dat er nog veel onduidelijkheden overblijven in deze gekende mechanismen. Bovendien bestaan er nog onontdekte pathways die een rol spelen in de pathofysiologie. Beiden moeten opgehelderd worden door verder onderzoek.

Derde vraag

Om op de derde vraag te kunnen antwoorden, werd de informatie, vergaard tijdens het literatuuronderzoek, gebruikt. Om geen onbegrensde opsomming van genen te bekomen, kwamen enkel genen waarvan de eiwitten een rol spelen in de biosynthese van type I collageen of in de bothomeostase in aanmerking. Deze beperking was een persoonlijke keuze en bijgevolg is de opsomming van de kandidaatgenen geenszins een volledige beschrijving van alle mogelijkheden. Immers de vorming van de componenten van de ECM is een zeer complex gebeuren. Het valt niet uit te sluiten dat er genen bestaan waarbij mutaties ook leiden tot een OI fenotype, zonder dat de eiwitten waarvoor ze coderen rechtstreeks verbonden zijn met de eerder vermelde processen. Als mogelijke kandidaten werden de genen die coderen voor P4H, PDI, protein-lysine 6-oxidase, BIP, calnexine en andere chaperone-eiwitten naar voor geschoven. De functie van deze eiwitten en de reden waarom ze bij mutatie mogelijks kunnen leiden tot AR OI werd besproken. Ook *PLOD1*, *PLOD3* en *ADAMTS2* werden onderzocht. De literatuur leerde echter dat mutaties in deze genen leiden tot andere klinische beelden zoals EDS, in het geval van *PLOD1* en *ADAMTS2*, en een bindweefselziekte met een fenotype dat karakteristiek is van verschillende bindweefselafwijkingen omvat, in het geval van *PLOD3*.

Conclusie

Lange tijd werd gedacht dat de pathofysiologie van OI te herleiden viel tot de aanwezigheid van abnormaal type I procollageen in de ECM van de verschillende bindweefsels. Volgens de oude redenering bevatte de afwijkende matrix ofwel te weinig type I collageen ofwel bevatte ze mutante vormen van dit eiwit. De oorzaak moest gezocht worden in mutaties in *COL1A1* en *COL1A2*. Onderzoek in de laatste jaren heeft echter tot nieuwe inzichten geleid.

Een eerste belangrijke ontdekking is dat OI ook door mutaties in andere genen veroorzaakt kan worden. Deze erven, met uitzondering van *IFITM5*, *AR* over. Er blijven nog (voorlopig) onontdekte kandidaatgenen over waarbij een mutatie tot OI zou kunnen leiden. Voorstellen hieromtrent werden gegeven in deze masterproef. Een tweede conclusie is dat de mechanismen die worden geïnitieerd door de mutaties een zeer belangrijke rol spelen in de pathofysiologie van de ziekte en een verklaring vormen voor de overlapping van het klinische beeld van mutaties in verschillende genen. De combinatie van het aanwezig zijn van mutante type I collageen proteïnen in de ECM, de continue activatie van NMD, UPR, APR of andere (voorlopig) onbekende ER-stress cascades, de apoptose van cellen, een dysfunctionele ECM en botmineralisatie en verstoorde cel-cel en cel-matrix interacties, ligt waarschijnlijk aan de basis van de pathofysiologie van de bindweefselziekte OI. Het is hierbij niet uitgesloten dat er nog mechanismen bestaan die nog niet ontdekt zijn. Bovendien zal door het geheel van deze pathofysiologische mechanismen er niet enkel een deficiëntie zijn aan normaal type I collageen in de ECM maar ook de biosynthese van andere (matrix)eiwitten kan gestoord zijn. In hoeverre dit laatste meespeelt in het ziekteproces, zal door verder onderzoek verduidelijkt moeten worden.(34)

Opmerking

Een belangrijke opmerking hierbij is dat de literatuurstudie die gevoerd is, slechts een deel van het OI-geheel belicht. Er werd informatie opgezocht in functie van de te beantwoorden onderzoeksvraag. Dit heeft tot gevolg dat er op bepaalde aspecten van OI minder is ingegaan. Om de masterproef overzichtelijk en begrijpelijk te houden, werden toelichtingen die té specialistisch waren achterwege gelaten. De lezer moet dit werk dus niet beschouwen als volledig en absoluut maar eerder als een soort kennismaking met het onderwerp 'OI'. Ten slotte moet ook de geldigheid van dit onderzoek geduïd worden. Artikels werden opgezocht tot en met februari 2013. Er worden echter maandelijks nieuwe papers gepubliceerd omtrent de materie. Het is dus niet uitgesloten dat bij het lezen van deze thesis er reeds nieuwe ontdekkingen gedaan zijn.

Slotwoord

OI geeft in deze masterproef een deel van haar geheimen prijs. Deze ziekte, die al sinds geruime tijd gekend is, blijft de wetenschappelijke wereld intrigeren. Op een ingenieuze manier leiden verschillende oorzaken tot een eenzelfde gevolg. Hoewel recente inzichten in de etiologie en pathofysiologie reeds een deel van de puzzel hebben opgelost, ontbreken er nog steeds enkele stukjes. Toekomstig onderzoek zal de resterende vragen moeten beantwoorden om zo het OI-plaatje te vervolledigen.

Referentielijst

1. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*. 2003 Nov 28;55(12):1531-46. PubMed PMID: 14623400. Epub 2003/11/19.
2. Kielty CM, Grant ME. The collagen family: Structure, assembly, and organization in the extracellular matrix. In: Royce PM, Steinmann B, editors. *Connective Tissue and its Heritable Disorders*. New York: Wiley-Liss; 2002. p. 159-22.
3. Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, Marini JC, Medscape. New perspectives on osteogenesis imperfecta. *Nature reviews Endocrinology*. 2011;7(9):540-57. PubMed PMID: 21670757. Epub 2011/06/15.
4. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends in genetics : TIG*. 2004 Jan;20(1):33-43. PubMed PMID: 14698617. Epub 2003/12/31.
5. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *Journal of cell science*. 2005 Apr 1;118(Pt 7):1341-53. PubMed PMID: 15788652. Epub 2005/03/25.
6. van Dijk FS, Cobben JM, Maugeri A, Nikkels PG, van Rijn RR, Pals G. [Osteogenesis imperfecta: clinical and genetic heterogeneity]. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*. 2012;156(21):A4585. PubMed PMID: 22617071. Osteogenesis imperfecta: klinische en genetische heterogeniteit.
7. Marini JC, Cabral WA, Barnes AM. Null mutations in LEPRE1 and CRTAP cause severe recessive osteogenesis imperfecta. *Cell and tissue research*. 2010 Jan;339(1):59-70. PubMed PMID: 19862557. Pubmed Central PMCID: 3156555. Epub 2009/10/29.
8. Marini JC, Cabral WA, Barnes AM, Chang W. Components of the collagen prolyl 3-hydroxylation complex are crucial for normal bone development. *Cell cycle*. 2007 Jul 15;6(14):1675-81. PubMed PMID: 17630507. Epub 2007/07/17.
9. Barnes AM, Carter EM, Cabral WA, Weis M, Chang W, Makareeva E, et al. Lack of cyclophilin B in osteogenesis imperfecta with normal collagen folding. *The New England journal of medicine*. 2010 Feb 11;362(6):521-8. PubMed PMID: 20089953. Pubmed Central PMCID: 3156560. Epub 2010/01/22.
10. Ha-Vinh R, Alanay Y, Bank RA, Campos-Xavier AB, Zankl A, Superti-Furga A, et al. Phenotypic and molecular characterization of Bruck syndrome (osteogenesis imperfecta with contractures of the large joints) caused by a recessive mutation in PLOD2. *American journal of medical genetics Part A*. 2004 Dec 1;131(2):115-20. PubMed PMID: 15523624. Epub 2004/11/04.
11. Makareeva E, Aviles NA, Leikin S. Chaperoning osteogenesis: new protein-folding disease paradigms. *Trends in cell biology*. 2011 Mar;21(3):168-76. PubMed PMID: 21183349. Pubmed Central PMCID: 3057343. Epub 2010/12/25.
12. Ishikawa Y, Vranka J, Wirz J, Nagata K, Bachinger HP. The rough endoplasmic reticulum-resident FK506-binding protein FKBP65 is a molecular chaperone that interacts with collagens. *The Journal of biological chemistry*. 2008 Nov 14;283(46):31584-90. PubMed PMID: 18786928. Epub 2008/09/13.
13. Byers P, Cole W. Osteogenesis Imperfecta. In: Royce P, Steinmann B, editors. *Connective Tissue and its Heritable Disorders*. New York: Wiley-Liss; 2002. p. 385-430.
14. Basel D, Steiner RD. Osteogenesis imperfecta: recent findings shed new light on this once well-understood condition. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2009 Jun;11(6):375-85. PubMed PMID: 19533842. Epub 2009/06/18.
15. Sillence DO, Rimoin DL. Classification of osteogenesis imperfect. *Lancet*. 1978 May 13;1(8072):1041-2. PubMed PMID: 76956. Epub 1978/05/13.
16. van Dijk FS, Cobben JM, Kariminejad A, Maugeri A, Nikkels PG, van Rijn RR, et al. Osteogenesis Imperfecta: A Review with Clinical Examples. *Molecular syndromology*. 2011 Dec;2(1):1-20. PubMed PMID: 22570641. Pubmed Central PMCID: 3343766.
17. Bishop N. Characterising and treating osteogenesis imperfecta. *Early human development*. 2010 Nov;86(11):743-6. PubMed PMID: 20846798. Epub 2010/09/18.
18. Semler O, Garbes L, Keupp K, Swan D, Zimmermann K, Becker J, et al. A mutation in the 5'-UTR of IFITM5 creates an in-frame start codon and causes autosomal-dominant osteogenesis imperfecta type V with hyperplastic callus. *American journal of human genetics*. 2012 Aug 10;91(2):349-57. PubMed PMID: 22863195. Pubmed Central PMCID: 3415541.
19. Rauch F, Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta. *Lancet*. 2004 Apr 24;363(9418):1377-85. PubMed PMID: 15110498. Epub 2004/04/28.
20. Martinez-Glez V, Valencia M, Caparros-Martin JA, Aglan M, Temtamy S, Tenorio J, et al. Identification of a mutation causing deficient BMP1/mTLD proteolytic activity in autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Human mutation*. 2012 Feb;33(2):343-50. PubMed PMID: 22052668.
21. Shaheen R, Alazami AM, Alshammari MJ, Faqeih E, Alhashmi N, Mousa N, et al. Study of autosomal recessive osteogenesis imperfecta in Arabia reveals a novel locus defined by TMEM38B mutation. *Journal of medical genetics*. 2012 Oct;49(10):630-5. PubMed PMID: 23054245.

22. van Dijk FS, Byers PH, Dagleish R, Malfait F, Maugeri A, Rohrbach M, et al. EMQN best practice guidelines for the laboratory diagnosis of osteogenesis imperfecta. *European journal of human genetics : EJHG*. 2011 Aug 10. PubMed PMID: 21829228. Epub 2011/08/11.
23. Kelley BP, Malfait F, Bonafe L, Baldrige D, Homan E, Symoens S, et al. Mutations in FKBP10 cause recessive osteogenesis imperfecta and Bruck syndrome. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2011 Mar;26(3):666-72. PubMed PMID: 20839288. Epub 2010/09/15.
24. Puig-Hervas MT, Temtamy S, Aglan M, Valencia M, Martinez-Glez V, Ballesta-Martinez MJ, et al. Mutations in PLOD2 cause autosomal-recessive connective tissue disorders within the Bruck syndrome--osteogenesis imperfecta phenotypic spectrum. *Human mutation*. 2012 Oct;33(10):1444-9. PubMed PMID: 22689593.
25. Colige A, Sieron AL, Li SW, Schwarze U, Petty E, Wertelecki W, et al. Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. *American journal of human genetics*. 1999 Aug;65(2):308-17. PubMed PMID: 10417273. Pubmed Central PMCID: 1377929.
26. Marini JC, Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, San Antonio JD, Milgrom S, et al. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Human mutation*. 2007 Mar;28(3):209-21. PubMed PMID: 17078022. Epub 2006/11/02.
27. Cheung MS, Glorieux FH. Osteogenesis Imperfecta: update on presentation and management. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2008 Jun;9(2):153-60. PubMed PMID: 18404382. Epub 2008/04/12.
28. Van Dijk FS, Nesbitt IM, Nikkels PG, Dalton A, Bongers EM, van de Kamp JM, et al. CRTAP mutations in lethal and severe osteogenesis imperfecta: the importance of combining biochemical and molecular genetic analysis. *European journal of human genetics : EJHG*. 2009 Dec;17(12):1560-9. PubMed PMID: 19550437. Pubmed Central PMCID: 2987020. Epub 2009/06/25.
29. van Dijk FS, Nesbitt IM, Zwikstra EH, Nikkels PG, Piersma SR, Fratantoni SA, et al. PPIB mutations cause severe osteogenesis imperfecta. *American journal of human genetics*. 2009 Oct;85(4):521-7. PubMed PMID: 19781681. Pubmed Central PMCID: 2756556. Epub 2009/09/29.
30. Christiansen HE, Schwarze U, Pyott SM, AlSwaid A, Al Balwi M, Alrasheed S, et al. Homozygosity for a missense mutation in SERPINH1, which encodes the collagen chaperone protein HSP47, results in severe recessive osteogenesis imperfecta. *American journal of human genetics*. 2010 Mar 12;86(3):389-98. PubMed PMID: 20188343. Pubmed Central PMCID: 2833387. Epub 2010/03/02.
31. Alanay Y, Avaygan H, Camacho N, Utine GE, Boduroglu K, Aktas D, et al. Mutations in the gene encoding the RER protein FKBP65 cause autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *American journal of human genetics*. 2010 Apr 9;86(4):551-9. PubMed PMID: 20362275. Pubmed Central PMCID: 2850430. Epub 2010/04/07.
32. Homan EP, Rauch F, Grafe I, Lietman C, Doll JA, Dawson B, et al. Mutations in SERPINF1 cause Osteogenesis imperfecta Type VI. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2011 Aug 8. PubMed PMID: 21826736. Epub 2011/08/10.
33. Lapunzina P, Aglan M, Temtamy S, Caparros-Martin JA, Valencia M, Leton R, et al. Identification of a frameshift mutation in Osterix in a patient with recessive osteogenesis imperfecta. *American journal of human genetics*. 2010 Jul 9;87(1):110-4. PubMed PMID: 20579626. Pubmed Central PMCID: 2896769. Epub 2010/06/29.
34. Boot-Handford RP, Briggs MD. The unfolded protein response and its relevance to connective tissue diseases. *Cell and tissue research*. 2010 Jan;339(1):197-211. PubMed PMID: 19851784. Pubmed Central PMCID: 2784867. Epub 2009/10/24.
35. Cornelissen M. Histologie van het bot. *Uit cursus histologie van het locomotorisch stelsel*. Gent: Universiteit Gent; 2009.
36. Rohrbach M, Vandersteen A, Yis U, Serdaroglu G, Ataman E, Chopra M, et al. Phenotypic variability of the kyphoscoliotic type of Ehlers-Danlos syndrome (EDS VIA): clinical, molecular and biochemical delineation. *Orphanet journal of rare diseases*. 2011;6:46. PubMed PMID: 21699693. Pubmed Central PMCID: 3135503.
37. Salo AM, Cox H, Farndon P, Moss C, Grindulis H, Risteli M, et al. A connective tissue disorder caused by mutations of the lysyl hydroxylase 3 gene. *American journal of human genetics*. 2008 Oct;83(4):495-503. PubMed PMID: 18834968. Pubmed Central PMCID: 2561927.

Bijlagen

Bijlage 1: TABEL 1 – Classificatie OI volgens genotype

Table 1 Nosology of osteogenesis imperfecta			
Osteogenesis imperfecta type	Inheritance	Phenotype	Gene defect
<i>Classical Silience types</i>			
I	AD	Mild	Null <i>COL1A1</i> allele
II	AD	Lethal	<i>COL1A1</i> or <i>COL1A2</i>
III	AD	Progressive deforming	<i>COL1A1</i> or <i>COL1A2</i>
IV	AD	Moderate	<i>COL1A1</i> or <i>COL1A2</i>
<i>Unknown etiology</i>			
V	AD	Distinctive histology	Unknown
<i>Mineralization defect</i>			
VI	AR	Mineralization defect, distinctive histology	<i>SERPINF1</i>
<i>3-hydroxylation defects</i>			
VII	AR	Severe (hypomorphic) Lethal (null)	<i>CRTAP</i>
VIII	AR	Severe to lethal	<i>LEPRE1</i>
IX	AR	Moderate to lethal	<i>PPIB</i>
<i>Chaperone defects</i>			
X	AR	Severe to lethal	<i>SERPINH1</i>
XI	AR	Progressive deforming (Bruck syndrome 1)	<i>FKBP10</i>

Tabel 1: uit Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, Marini JC, Medscape. New perspectives on osteogenesis imperfecta. Nature reviews Endocrinology. 2011;7(9):540-57

Bijlage 2: TABEL 2 – Classificatie OI volgens fenotype

Type	Subtype		Gene
Type I		}	Osteogenesis Imperfecta
Type II	→ A ¹ B ² C ³	}	Osteogenesis Imperfecta
Type III			
Type IV			
Type V		}	Osteogenesis Imperfecta
[Type VI] ⁵			
			{ COL1A1/2-related CRTAP-related LEPRE1-related ⁴ PPIB-related
			Unknown

Tabel 2: uit Van Dijk FS, Pals G, van Rijn RR, Nikkels PG, Cobben JM: Classification of Osteogenesis Imperfecta revisited. Eur J Med Genet 53: 1–5 (2010c).

Bijlage 3: TABEL 3 – Eigen classificatie OI volgens genotype

Classificatie Osteogenesis Imperfecta				
Type OI	Gen	Proteïne	Ernst van fenotype	Kenmerken
I	<i>COL1A1</i>	$\alpha 1(I)$	Mild	±normale gestalte, blauwe sclerae, gehoorsverlies, zelden dentinogenesis imperfecta
II	<i>COL1A1</i> <i>COL1A2</i>	$\alpha 1(I)$ $\alpha 2(I)$	Letaal	extreem korte gestalte, intra-uteriene fracturen, korte ribben, blauwgrijze sclerae, grote + weke+deels onverbeende schedel
III	<i>COL1A1</i> <i>COL1A2</i>	$\alpha 1(I)$ $\alpha 2(I)$	Ernstig	kleine gestalte, deformaties, grijze sclerae, gehoorsverlies, dentinogenesis imperfecta, triangulair facies, kyphoscoliose
IV	<i>COL1A1</i> <i>COL1A2</i>	$\alpha 1(I)$ $\alpha 2(I)$	Matig tot ernstig	kleine gestalte, witte (grijze) sclerae, gehoorsverlies op volwassen leeftijd, dentinogenesis imperfecta
V	<i>IFITM5</i>	interferon induced trans-membrane protein 5	Mild tot matig	matige gestalte, witte sclerae, geen dentinogenesis imperfecta, calcificatie van het interosseus membraan, luxatie van de kop van de radius, hyperplastische callusformatie
VI	<i>SERPINF1</i>	Pigment-derived epithelium factor (PEDF)	Matig tot ernstig	matige gestalte, witte sclerae, geen dentinogenesis imperfecta, visschubachtig patroon van de botlamellen
VII	<i>CRTAP</i>	Cartilage-associated protein	Ernstig tot letaal	matige gestalte, witte sclerae, geen dentinogenesis imperfecta, rhizomelie, coxa vara
VIII	<i>LEPRE1</i>	prolyl 3-hydroxylase 1 (P3H1)	Ernstig tot letaal	ernstige groeistoornissen, ondermineralisatie van de botten, congenitale fracturen, scoliose, witte sclerae, rhizomelie, 'popcorn epiphysen',
IX	<i>PPIB</i>	Peptidyl-prolyl isomerase B	Ernstig tot letaal	ernstige groeistoornis, grijs-witte sclerae, gebogen ledematen
X	<i>SERPINH1</i>	Heat shock protein 47 (HSP47)	Ernstig	Korte, gebogen femur, blauwe sclerae, dentinogenesis imperfecta, triangulair facies, nierstenen
XI	<i>SP7</i>	Osterix	Matig	korte ledematen, smalle mond, witte sclerae, geen dentinogenesis imperfecta
XII	<i>FKBP10</i>	FK506-binding protein 10 (FKBP65)	Matig tot ernstig	scoliose, grijs-witte sclerae, geen dentinogenesis imperfecta, visschubachtig patroon van de botlamellen, contracturen van de gewrichten
XIII	<i>BMP1</i>	Bone Morphogenetic protein 1	Ernstig	triangulair facies, lichtblauwe sclerae, afwezigheid van dentinogenesis imperfecta en gehoorsverlies, abnormaal grote thorax
XIV	<i>TMEM38B</i>	Trans Membrane Protein 38B	Matig	multiple fracturen, osteopenie, witte sclerae, geen dentinogenesis imperfecta, geen gehoorsverlies

Bijlage 4: Lijst met gebruikte afkortingen

Betekenis van afkortingen	
AD OI	autosomaal dominante osteogenesis imperfecta
ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
APR	aggregated protein response
AR OI	autosomaal recessieve osteogenesis imperfecta
ATF6	activating transcription factor-6
Bip	binding immunoglobulin protein
BMP1	bone morphogenetic protein 1
BS	Bruck syndroom
CHOP	CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein
CRTAP	cartilage associated protein
CyPB	cyclophiline B
DNA	desoxyribonucleïnezuur
ECM	extra-cellulaire matrix
EDS	Ehlers-Danlos syndroom
ER	endoplasmatisch reticulum
ERAD	endoplasmic-reticulum-associated degradation
Gly	glycine
HSP47	heat shock protein 47
IFITM5	interferon induced transmembrane protein 5
IRE-1	inositol-requiring enzyme-1
LH	lysyl hydroxylase
MRB	medical research building
mRNA	messenger RNA
NMD	nonsense-mediated mRNA decay
OI	osteogenesis imperfecta
P3H1	prolyl 3-hydroxylase 1
P4H	L-proline trans-4-hydroxylase
PDI	proteïne disulfide isomerase
PEDF	pigment epithelium-derived factor
PERK	pancreatic ER eukaryotic translation initiation factor 2a kinase
PICP	procollageen I C-terminale propeptide
PPIB	peptidyl-prolyl isomerase B
pre-mRNA	pre-messenger ribonucleïnezuur
PTC	prematuur stopcodon
rER	ruw endoplasmatisch reticulum
TLL	tolloid-like protein
TRIC	trimeer intracellulair Ca ²⁺ -cation kanaal
UPR	unfolded protein response
VEGF	vasculaire endotheliale groeifactor